

Lezione di Anatomia Patologica del 10/10/2013 (1)

Professor Chilosi

Sbobinatore: Luca Sgarabotto

Revisore: Caterina Butturini

Lezione introduttiva sulla tipologia di esame e sulla preparazione che richiediamo.

L'Anatomia Patologica nel primo e secondo semestre viene aggregata a Patologia Sistemica; poi ci sarà un esame al quinto anno di Anatomia Patologica che avrà come oggetto tutto ciò che è stato fatto nella Patologia Sistemica, perché va integrata con le altre discipline.

Vi parlerò di Ematopatologia nelle prossime 4 lezioni, il dottor Zamboni approfondirà il gastro-intestinale e pancreatico, poi nel secondo si approfondirà la patologia polmonare e Zamboni seguirà altre cose.

Legge l'obiettivo del corso e curriculum: "Particolare attenzione sarà posta nel presentare le più moderne innovazioni tecnologiche e l'impatto che stanno avendo in campo clinico e patologico". Venire a lezione serve poiché quello che si spiega non si trova nei libri, non serve studiare solo ed esclusivamente sui libri, perché serve riuscire a capire dalle lezioni cosa c'è di rilevante e di nuovo, perché quello che è attualmente nuovo sarà vecchio quando voi comincerete a lavorare e vecchissimo quando dovrete cominciare di nuovo ad aggiornarvi.

Descrizione delle modalità d'esame:

L'esame è piuttosto complesso (consiglia di passare a vedere gli esami dei colleghi più vecchi per rendersi conto), non giustissimo per equanimità, poiché le commissioni variano in 3 membri, che ruotano a caso, le commissioni sono miste. La preparazione quindi dev'essere completa su tutti i programmi. Le commissioni sono fatte di persone che hanno preparazione diversa e esaminano le loro competenze, ma i patologi sono dei jolly perché competenti un po' in tutto, quindi possono fare domande di ematologia, reumatologia, dermatologia, sia per quanto concerne l'anatomia patologica, sia verificando la preparazione complessiva.

LA PATOLOGIA SISTEMATICA:

Patologia sistemica fa affrontare le malattie: dopo aver posto le basi in 3 anni, si inizia ad entrare nell'ottica della medicina vera, quella professionale. Nella costruzione della conoscenza in senso occidentale, si mettono le basi, poi si mettono le basi della conoscenza specialistica e quindi sistemica; bisogna sistemare in archivi le conoscenze relative alle malattie. Quindi si deve sapere quante malattie esistono, cioè quasi tutte, non solo quelle più frequenti, ma anche quelle più rare; infatti il medico bravo, anzi quello accettabile non è quello che sa solo diagnosticare e cercare di trattare le malattie comuni, ma quello che riesce a distinguerle dalle malattie meno comuni. Quindi per poter individuare una malattia bisogna sapere che esiste. L'ausilio mnemonico dev'essere coadiuvato da una classificazione per insiemi e bisogna saperli mettere in raccordo uno con l'altro. Fermarsi alla conoscenza sistemica non sarà sufficiente, poiché le soluzioni vanno trovate caso per caso, sapendo sfruttare le conoscenze in archivio; bisogna quindi saper passare da un insieme all'altro, facendo delle correlazioni veloci. Questo è il metodo per poter arrivare correttamente alla diagnosi. La terapia è meno complessa poiché esistono delle linee guida; è la formulazione diagnostica ad essere intellettualmente più complessa.

La **classificazione** delle malattie ha avuto grosso supporto dalla classificazione patologica delle malattie: la patologia è la base di molte classificazioni. Per esempio, in oncologia le classificazioni sono tutte ad alto contenuto patologico sulla base delle caratteristiche del singolo tumore (esempio tumore epiteliale, tumore mesenchimale, patologia linfoide etc.); quindi qui la classificazione patologica è quella che guida la classificazione. Le malattie non neoplastiche hanno altri criteri classificativi: ad esempio, le malattie infettive hanno come criterio gli agenti etiologici. La patologia ha come grandissimo campo di applicazione l'anatomia patologica in campo oncologico, ma anche in altre innumerevoli applicazioni pratiche.

Due aspetti della disciplina e della preparazione che dovete avere:

• *f* L'anatomia patologica come disciplina, come scienza, in cui si studia il meccanismo patogenetico delle malattie a livello anatomico/macroscopico, microscopico e molecolare, un insieme che definisce come nasce e come si sviluppa la malattia in quanto alterazione di tessuti ed organi. Quindi un concetto importante e "teorico" che esula dall'applicazione clinica. Esempio: conoscere lo sviluppo del diabete, la sua etiologia e patologia è un concetto molto chiaro e noto nei dettagli, ma da biopsia operativa del pancreas per la diagnosi o per qualsiasi altro concetto del diabete non esiste.

• *f* Applicazione clinica e ruolo diagnostico operativo nell'ospedale della anatomia patologica in senso lato. Quindi tutte le applicazioni, le metodiche operative e come si coordina con le altre specialità è un altro argomento molto importante di cui essere consci perché noi saremo tutti "clienti" del servizio anatomia patologica.

Quindi due concetti diversi da distinguere e integrare.

Esistono interi libri dell'WHO che classificano le neoplasie sulla base delle caratteristiche patologiche, che contengono anche la genetica, in quanto la patogenesi in oncologia è strettamente legata alla comprensione dei meccanismi molecolari che portano al vantaggio clonale di una particolare popolazione cellulare che sviluppa un vantaggio e infila e sostituisce un tessuto normale, provocando le alterazioni che sono la patologia d'organo che definisce la malattia.

Quindi la conoscenza delle classificazioni è importante. Si deve formare nozione delle singole malattie, così da poter conoscere le "**entità nosografiche**" approfonditamente così da poterle ricordare più facilmente. Il segreto per ricordare gli elenchi è ricordare caratteristiche distintive che diano connotati alle singole denominazioni.

Dovremo conoscere la frequenza, le caratteristiche legate a diverse sottogruppi di pazienti: per esempio l'età pediatrica- delle forme che se ben diagnosticate e curate possono portare alla guarigione ma se malamente trattate possono avere un esito infausto. È quindi importante farsi guidare nella scelta di cosa sapere dalle informazioni che vi diamo, ma anche da criteri generali di buon senso e rilevanza.

Un altro concetto importante è quello **dell'evoluzione delle conoscenze** che è continua e l'aggiornamento anche su componenti specialistici diventa complicato: es per i linfomi sono state proposte nel tempo 3 diverse classificazioni, attualmente è stabile e le variazioni sono minime, quindi si può usare quella aggiornata WHO 2007/8 e si aspetta quella del 2015. Ogni aggiornamento comunque ha avuto variazioni significative: le prime hanno beneficiato da diverse scoperte di immunologia e biologia molecolare; adesso ci troviamo in una situazione di plateau di conoscenza elevata. Per altre specialità il processo è più "movimentato" e le classificazioni cambiano da una versione all'altra. Attualmente dal 2000 in poi la classificazione dei tumori del sistema ematopoietico e dei tessuti linfoidei è abbastanza stabile; sul mieloido qualche novità, sui linfomi dal 2000 in poi le novità sono poche in quanto precocemente è stata eseguita in modo corretto ed esaustivo tutta una serie di criteri e di parametri che quindi dobbiamo conoscere approfonditamente.

A differenza di molti altri esempi in oncologia, la **precisione diagnostica** in oncologia ematologica può portare a notevolissime differenze di esito riguardo alla scelta terapeutica; per cui una LLC (leucemia linfatica cronica) che normalmente è una patologia indolente con dei piccoli linfociti al suo interno ha delle eterogeneità prognostiche e di risposta alla terapia notevoli nel momento in cui si individuano dei sottogruppi caratterizzabili dal punto di vista molecolare o con dei parametri e dei marcatori biologici particolari.

Quindi la raffinatezza diagnostica anche nell'individuare dei sottotipi, laboristicamente individuabili, porta ad un cambiamento notevole nella possibilità di trattare correttamente il paziente. La **diagnostica differenziale** in patologie simili è importante; ad esempio un linfoma di Hodgkin o un linfoma B a grandi cellule del mediastino può far la differenza vita morte a seconda della scelta terapeutica e della precocità. Maggiore è la comprensione quindi maggiore è la capacità di ricordare. Ad esempio quando uno capisce che un certo tipo di patogenesi molecolare caratterizza un certo tipo di neoplasia che risponderà ad un certo tipo di trattamento, questa conoscenza lo assisterà.

Oggi i supporti esterni sono importanti, come l'utilizzo di motori di ricerca che consentono rapidità ricerca; utile, se si sa cosa cercare. Questi mezzi vanno integrati con la capacità di discernimento della complessità.

Metodo di studio

-Entità Nosografiche: bisogna conoscerle dal punto di vista clinico, quindi come si diagnostica, come in radiologia etc e inserire elementi di conoscenza di alterazioni tissutale caratteristiche che caratterizzano l'entità nosografica.

-Classificazioni

-Tecniche Diagnostiche: percorsi diagnostici che portano alla diagnosi di precisione utilizzando delle tecniche che bisogna conoscere. Ad esempio un BAL (lavaggio bronco-alveolare) consente di vedere al microscopio un certo tipo di popolazione cellulare. L'inserimento di questa tecnica abbastanza invasiva in un quadro di procedimento, che è più legato alla preparazione di discipline o test dei prossimi anni, ma che dovrete acquisire in questo momento altrimenti vi troverete in difficoltà

-Informazioni Pregresse: istologia normale, organogenesi, fisiologia sono utili per ricostruire le alterazioni di quel fisiologico.

Quindi da tenere a mente l'istogenesi, l'organogenesi e la fisiologia dei diversi tessuti. Per esempio, nel sistema linfoemopoietico dovrete ricordare tutte le linee di differenziazione funzionali e la conoscenza e la padronanza nel distinguere un macrofago da un monocita o una cellula APC o le cellule follicolari dendritiche e i diversi sottotipi di linfociti (Th1/2 CTL Helper). Una conoscenza di base è essenziale per non perdersi nella complessità di cose da affrontare.

ENTITÀ NOSOGRAFICHE

Sono le malattie.

- Il linfoma di Hodgkin (trattato in una delle prossime lezioni): saranno descritte le caratteristiche della malattia dell'alterazione del tessuto linfoide, come si presentano le cellule neoplastiche e come sono le cellule etc

- Carcinoma del polmone e Sindrome di Sjogren: queste due non sono un'entità. Il linfoma di Hodgkin è un'entità, si suddivide in vari tipi e in varie forme (esiste un linfoma di Hodgkin di tipo classico e quello a prevalenza linfocitaria nodulare). Collegare l'entità linfoma di Hodgkin a un qualcosa di vago e di indistinto è un'insufficienza inaccettabile, va approfondito e conosciuto.

Quindi all'interno dell'entità nosografica dovete individuare le eterogeneità significative.

Gli **strumenti diagnostici** dell'anatomia patologica sono prevalentemente di tipo morfologico. I nostri predecessori osservavano le alterazioni d'organo all'interno dei cadaveri e da queste alterazioni si riescono ad ottenere informazioni utili per la malattia.

A ciò si unisce la Microscopia, cioè l'alterazione a livello tissutale, cioè le alterazioni all'interno del tessuto delle cellule e dei rapporti tra cellula e cellula, le atipie (alterazioni significative) costruendo un'enorme quantità di dati capaci di permettere una diagnosi di precisione semplicemente osservando le alterazioni in un determinato tessuto.

Le metodologie che ci consentono di ottenere il tessuto sono varie, la medicina moderna sta cercando sempre di più di minimizzare l'invasività nell'ottenere i campioni di tessuto, quindi avremo la distinzione tra istologia e citologia.

Ci sono poi i prelievi citologici e vedremo gli strumenti diagnostici per avere in mano il campione che è poi quello che si va a testare.

Non ci si ferma alla morfologia, che consente solo un certo livello di dettagli delle informazioni non più sufficiente rispetto alle esigenze della clinica moderna. Per cui la precisione diagnostica dev'essere aumentata rispetto alla morfologia con tutta una serie di dati che si possono ottenere con tutta una serie di metodologie che consentono di distinguere meglio, e più velocemente la differenziazione e l'istogenesi con profili immunofenotipici o con metodi istochimici.

Poi c'è la patologia molecolare che è la più in sviluppo: qui non solo si cerca di capire le alterazioni molecolari che portano a vantaggi proliferativi nei tumori, ad esempio, ma anche a utilizzarle come mezzi diagnostici e predittivi rispetto alle terapie biologiche attualmente in uso.

Le autopsie

Se si cerca su Google anatomia patologica e si cercano immagini, si ottengono soprattutto immagini di tipo autoptico, in quanto l'anatomia patologica è nata come autopsie, ma non è attualmente l'attività di maggior interesse e importanza, anche perché molte

cose si sono già capite e conosciute da questo tipo di esame (non si va certo su Science con quello che si può scoprire da un'autopsia).

Le autopsie sono utili soprattutto alla medicina legale che è però un'altra disciplina.

Il laboratorio è il posto dove arrivano i pezzi anatomici (per esempio il colon tolto dal chirurgo, la milza, le ovaie etc), ma i laboratori hanno un connotato diverso con strumentazioni che consentono l'individuazione di parametri non soltanto microscopici. Slide che illustra la Refertazione 2012:

- 14000 per preparati istologici

- 6000 esami citologici

- 1000 immunoistochimica (FISH)

- le autopsie sono state 42 (chi vuole vederle passa in segreteria e lascia il numero telefonico) e così anche all'estero. È stata proposta una Virtual Autopsy (in sedi estere), che è tipo una TAC ed ha un significato in medicina legale. Esistono siti con autopsie virtuali con guida e esercizi che consentono di orientarsi nell'analisi autoptica. L'autopsia sta scendendo di numeri poiché i parenti non danno il consenso all'autopsia sul congiunto defunto.

Attività Operative

Biopsie: vanno approfondite con altri esami (immunoistochimica e patologia molecolare) sul tessuto ove richiesto. Ce ne sono di vari tipi, dimensione, forme a seconda dell'organo e della profondità e accessibilità; ci sono molti tipi di processi invasivi che consentono ottenimento di un campione: dove, come, quando e se farla sono decisioni delegate al clinico per ottenere le informazioni utili per avanzare nel processo di diagnosi differenziale. Per richieste errate di effettuazione di esami istologici esiste una responsabilità di tipo professionale che si deve basare sulla competenza: la decisione di effettuare una qualunque tipo di procedura biopica dipende dal quesito e dalla conoscenza di quello che si può ottenere (richiede criterio e conoscenza delle implicazioni; sono procedure invasive comunque, ma talvolta indispensabili).

L'**esame intra-operatorio** è un esame istologico durante procedura operatoria, mentre il paziente è in anestesia quindi dev'essere un esame rapido ed estemporaneo. Serve farlo in urgenza. Per poter ottenere una sezione di tessuto si congela un frammento, si taglia con un criostato e colorandolo per vederlo al microscopio. Si chiama esame al congelatore: meno informativo di uno successivo a fissazione e inclusione. Va riservato solo a richieste di informazioni urgenti e critiche durante un intervento. Esempio se il chirurgo ha bisogno di sapere se il materiale che preleva è idoneo o non è tutto necrotico, oppure i margini della neoplasia, per sapere quanto allargare i margini dell'escissione.

La **Citologia** è meno invasiva. Si fa con aghi sottili che possono raggiungere masse anche profonde, tac o eco guidate. Il prelievo è scarso e si ottengono cellule separate l'una dall'altra, si perde il contesto istologico, quindi sono meno informative ma meno invasive. Quindi quando l'esame comunque sia esaustivo e sia una risposta chiara è sufficiente per la diagnosi. Questo tipo di esame in alcuni contesti può produrre un quantitativo di materiale insufficiente per tutti gli esami necessari per l'approfondimento molecolare e quindi ci sono vari approcci per aumentare il quantitativo di tessuto prelevato.

Questi sono i metodi di prelievo e le tipologie dei campioni. Le analisi che si devono fare quando necessario sono l'esame morfologico, immuno fenotipico per la caratterizzazione, l'esame molecolare se richiesto quando necessario.

Testi: *Anatomia Patologica Le Basi* (da consultare) (preparato qui in sede con vari collaboratori nazionali nel quale vengono discusse tutta una serie di tipologie metodologie), il *Robbins-Cotran* è quello consigliato.

METODOLOGIE

CITOLOGIA DIAGNOSTICA

Le tipologie di esame citologico sono molte. Domanda da esame: Cos'è un esame citologico? Domanda spesso nefasta. Tanti più esempi si possono presentare meglio è, anche di come si fanno (parte operativa). Il contesto dell'inserimento operativo è importante, assieme agli esami radiologici e ai test di laboratorio (sono da sapere i valori standard dell'emocromo, ad esempio). Nessuno chiede di saper distinguere le varie cellule neoplastiche, ma sapere come si inseriscono nei contesti diagnostici questi esami è importante. Saper interpretare un referto (potrebbe essere chiesto in un esame), nel contesto delle varie patologie (pneumo, ematologia, epatologia). Serve saper sintetizzare le informazioni cliniche utili. L'interpretazione istologica serve per riconoscere ove possibile, ma anche per isolare aree di rischio (es linfadenopatia isolata inguinale in un sessantenne è diversa come rilevanza clinica e di sospetto da una poliadenopatia diffusa in un 35enne. Bisogna saper guardare il preparato con critica cercando per esempio virus cercando cose non facilmente individuabili morfologicamente, questo quindi mi guida e mi fa evitare errori).

Cito-diagnostica (segnala un sito presente sulle slide per chi vuole approfondire, nelle lezioni non si riescono a descrivere tutte le cose in programma, loro mirano a darci dei criteri di scelta per come approfondire gli argomenti, dato che il programma è molto più vasto degli argomenti trattati a lezione, esempio dermatopatologia, reumatologia, malattie infettive, la loro trattazione sarà personale, sarà quindi da trasportare l'approccio fornito a lezione su questi argomenti).

Mostra slide con le sedi più comuni di campioni citologici, quindi il sospetto di un determinato tipo di malattia può essere risolto dall'individuazione di particolari cellule presenti in campioni ottenuti citologicamente. Esempi:

-il liquor può essere sede di coinvolgimento in linfoma di Burkitt leucemia acuta (processi linfoproliferativi in generale, è un coinvolgimento che va provato o escluso e dà un'informazione critica molto importante).

-Un BAL può dare informazioni su infezione da *Pneumocystis Carinii*.

-Il brushing è lo spazzolamento di mucose per ottenere delle cellule da esaminare per vedere se ci sono delle displasie o delle franche atipie che indirizzano ad esempio per un carcinoma squamoso del bronco o dell'esofago.

-Il PAP test che è un esame citologico, con tutte le implicazioni nello screening del cancro della cervice. I PAP test sta venendo sostituito da test molecolari che individuano il papilloma virus, sostituendo l'esame morfologico-citologico, o a cui si affianca.

Comunque la ginecopatologia non è argomento del primo semestre.

AMBITO EMATOPATOLOGICO

Esistono l'esame del sangue periferico e del sangue midollare, da cui si ottiene il mielogramma. Questi test morfologici sono molto importanti, possono essere effettuati da ematologi (striscio di midollo osservato da ematologi che sono anche citologi, fanno un po' anche da citopatologi per quanto riguarda la loro competenza). Hanno l'emocromo cui si aggiunge anche lo striscio di sangue da cui possono ottenere nozioni sul numero e la morfologia degli elementi figurati, degli eritrociti, la presenza di cellule mature, di anomalie dei neutrofilo.

Nel midollo si può fare il **Mielogramma** che è la conta dei diversi tipi di precursore o di cellula matura con la costruzione della frequenza di quella che può essere normale o patologica, valutando la presenza e la quantità di blasti, numerosità elementi maturi etc. Il prelievo di midollo si effettua dalla spina iliaca superiore posteriore con dei vari aghi e questo è fatto in ematologia. Dove non c'è l'ematologia o dove gli ematologi non lo considerino un loro compito questo (interpretazione del vetrino e del campione, e non procedura) viene delegato o all'anatomia patologica o al laboratorio di biochimica clinica, anch'essi competenti nell'esame citologico. Del mielogramma saranno gli ematologi a dire come e quanto bisognerà sapere.

Complementare o in alternativa all'esame citologico del midollo è la **Biopsia Osteomidollare**. Effettuata con dei trapanetti (trephine), si ottengono carote di tessuto con trabecole (osso spugnoso). Questo viene fissato, decalcificato (rovinerebbe lame), quindi se ne ottengono delle sezioni e analisi al microscopio in cui midollo non viene esaminato come insieme di cellule isolate. Il dettaglio morfo-citologico è elevato: si può osservare la cromatina se è addensata o fine, il rapporto nucleo citoplasma, la basofilia del citoplasma, contenuto e colori granuli; si possono eseguire test citochimici per confermare la natura mieloide o per ricerca di esterasi (caratterizza i monociti) o perossidasi endogena. Tutte cose che consentono riconoscimento fine per fare mielogramma.

Nella biopsia abbiamo il contesto istologico ed è il punto di forza della istologia rispetto alla citologia: distinguo le trabecole ossee e le cellule adipose, più si è giovani più aumenta la cellularità, più si è vecchi più aumenta la componente adiposa. Quindi conoscendo l'età del paziente io posso dire se il midollo è ipo o iper rappresentato secondo dei parametri.

In una malattia mieloproliferativa aumenta componente mieloide e megacariocitaria. Un aumento dell'eritropoiesi si caratterizza con un aumento degli eritroblasti che aumentano in una sindrome carenziale come l'anemia megaloblastica, in carenza di folati o B12.

Può essere elevato in malattie clonali come le Sindromi Mielodisplastiche. La presenza di infiltrati linfoidi o plasmacellulari possono essere individuati anche se non molto rappresentato con molta precisione anche se in percentuale non molto elevati: ad esempio un nodulo linfoide può essere singolo e mentre io faccio un aspirato (faccio una media delle cellule presenti in midollo) il nodulo si disgrega la sua percentuale di rappresentatività può diluirsi e non essere più visibile. La biopsia osteomidollare è quindi un esame che dà informazioni diverse e complementari allo striscio.

I campi di applicazione sono diversi: per leucemie acute, mielodisplasie, mieloproliferative croniche lo striscio è quasi sempre sufficiente. Per mieloproliferative è utile biopsia, se c'è fibrosi midollare un aumento dei fibroblasti e collagene che intrappolano il tessuto emopoietico e quindi ho la punctio sicca o dry tap all'aspirato midollare: ciò può derivare da fibrosi (midollo pieno) o aplasia midollare (midollo vuoto); così con "carota" il patologo vede se è pieno se è vuota e se è pieno di cosa è pieno (con un procedimento di esame morfologico vedo ad esempio: plasmacellule se è un mieloma plasmacellulare - componente mieloproliferativa come una fibrosi idiopatica o fibrosi da metastasi di carcinoma prostata o mammella). È quindi una procedura che mi dà molte informazioni sulle alterazioni rilevanti.

Le biopsie osteomidollari vengono fatte in numero di circa 1500 all'anno che si distinguono in esito diagnostico. Servono anche per stadiazione e monitoraggio (indicazione maggiore) dei processi linfoproliferativi: per quanto riguarda l'utilità diagnostica rilevano soprattutto i linfomi non Hodgkin 42%. Nei linfomi e malattie ematologiche in generale serve per valutare lo spread della malattia e il coinvolgimento midollare per dare una valutazione prognostica e per dare informazioni sulla modificazione della terapia da somministrare. Nel linfoma di Hodgkin (11% dei casi di biopsia osteomidollare) nel momento in cui si riscontra contaminazione del midollo dà informazioni sullo stadio maggiore della malattia. Nei linfomi in generale valuta il coinvolgimento midollare.

Nelle forme leucemiche (la Hairy Cell Leukemia o forme leucemiche linfoproliferative) il midollo è francamente coinvolto; quindi questo esame serve per capire la rilevanza dell'infiltrazione: per esempio la leucemia linfatica cronica che interessa midollo è meno preoccupante se midollo è modestamente contaminato piuttosto che impaccato, indice di gravità maggiore. Il campione è molto utile per l'approfondimento immunofenotipico, per capire il tipo di linfoma che l'ematologo si trova di fronte. Ad esempio una neoplasia ematologica localizzata in sedi profonde del mediastino è difficilmente raggiungibile se non con procedimento invasivo: prima di mandare il paziente dal chirurgo toracico si valuta il coinvolgimento midollare. Per esempio in un linfoma linfoblastico tipo T si valuta prima se c'è il coinvolgimento midollare (che è indicativo di questa particolare malattia). Quindi la diagnosi è sia radiologica che con biopsia del midollo, così si velocizza la diagnosi e quindi la somministrazione della terapia. 11% delle biopsie osteomidollari si esegue per gammo-patie monoclonali (mieloma plasmacellulare è una quota o presenza di un clone plasmacellulare in diagnosi di gammopatie). Mielodisplasie 7% - metastasi 3% - aplasie 1% - leucemie acute 4%.

Il prodotto dell'esame istologico è un'informazione che viene data tramite una telefonata e uno scritto per responsabilità e per prassi. **La qualità delle informazioni dipende dalla qualità della domanda** (corretto inquadramento in processo di diagnosi differenziale) e delle tecnologie da applicare al campione oltre alla competenza dell'esaminatore. L'istopatologia è un servizio all'interno dell'azienda ospedaliera.

Lezione di Anatomia Patologica del 18/10/2013

Professor Chilosi

Sbobinatore: Chiara B. Santoro

Revisore: Sara Grendele

Come detto anche dal professor Pizzolo, l'innovazione in ematologia, ma non solo, è sempre più rilevante e la vostra generazione dovrà subire o cavalcare l'innovazione sempre di più e quindi il concetto di ricerca applicato alla medicina dovrebbe uscire dalla dinamica diciamo festosa o drammatica delle chiacchiere, da quelle delle frasi poco attendibili ("l'università sede primaria di libera ricerca"). Una delle cose che mi ha dato sempre un senso di sgomento è come in effetti l'università sia, specialmente a medicina, la sede di ricerca e innovazione ma la scuola di medicina e gli studenti di medicina partecipano pochissimo all'attività di ricerca non solo non facendola, perché ovviamente ne sono marginali, ma non ne percepiscono neanche la dimensione né conoscono cosa si faccia per esempio all'università di Verona in quanto a ricerca in tutte le varie componenti anche perché i mezzi di comunicazione e trasmissione sono sempre minori e sempre più legati all'esigenza di insegnare una professionalità e una metodologia e quindi di mettervi in grado di diventare medici; la dimensione dell'innovazione è quindi un po' sottosviluppata. Comunque l'università di Verona come probabilmente percepite più dall'Arena che dall'università, a parte le occasioni di magnificenza (questo per esempio è l'ex rettore che comunicava come l'università di Verona fosse al terzo posto; tutte queste manifestazioni un po' mutate dal mondo del calcio più che dalla scienza). Inoltre immagino che abbiate la percezione di quanto sia complessa la situazione in Italia in cui vengono prodotte una quantità enorme di dati e di innovazione e in effetti la collocazione internazionale non è malissimo nonostante la situazione di ipodisponibilità di risorse ma anche di distribuzione errata di risorse che portano ad una serie di problemi che incontrerete sempre di più nel vostro percorso.

Attualmente la frustrazione del corpo ricercatore dell'università sta raggiungendo dei livelli molto elevati da tutti i punti di vista come il ruolo, la retribuzione, la capacità di sviluppo della propria attività. Di questo non so quante volte ne parliate con i vostri docenti, io brevissimamente ho voluto dare queste serie di flash anche perché credo sia fondamentale legare il mondo della ricerca e dell'innovazione a quello della costruzione di una professionalità che non deve e non può essere legata all'imparare schemi, situazioni e dati come immutabili; la caratteristica più chiara della medicina è che tutto evolve e giorno per giorno noi abbiamo questa percezione.

Cosa hanno di positivo e negativo le università italiane: i dibattiti sono complessi. Avrete sicuramente affrontato la problematica dell'ingresso programmato a medicina; si cerca di capire se sia giusto o no, quali siano le alternative: facciamo come una volta, ovvero duecentomila studenti con strutture gracili, oppure ci si appoggia ad una selezione d'ingresso? E questa selezione fatta su che base? ovvero i quiz sono idonei? Sufficienti? Probabilmente a voi ormai non interesserà più però se dovrete fare la specialità dovrete rifare un percorso di ammissione in cui c'è tutta la problematica locale e nazionale; è giusto che ci sia soltanto una delega quiz e chi arriva primo sceglie? Quindi tutta una serie di problematiche per cui nel momento in cui vorrete fare la specialità che abbiamo scelto e l'unico posto sarà a Messina questo potrebbe essere leggermente complicato!

Università grandi o piccole? Questo è un recente articolo del Corriere di un disertatore (?! Ndr) che dice che il problema delle università italiane è che sono troppo piccole: se noi paragonassimo quelle negli Stati Uniti con le nostre dovremmo avere due università a basta! Non so se il modello sia corretto.

Comunque sia ricerca vuol dire scienza, diffusione. Voi su che mezzo di informazione vi basate? Ovviamente sui libri, su quanto vi diciamo noi a lezione ma sempre di più, soprattutto quando volete approfondire e aggiornare le informazioni dovete utilizzare dei testi, delle fonti scientifiche. Storicamente le riviste scientifiche sono state create e fatte crescere sulla base di criteri molto chiari di peer review, ovvero ogni lavoro viene sottoposto a più giudizi che decidono se una pubblicazione scientifica riporta la descrizione di dati importanti, se il farmaco funziona oppure no e così via. Si evitano quindi tutta una serie di problematiche legate a conflitti d'interesse, alla diffusione di informazioni legate non solo a interessi scientifici e così via.

Quindi le fonti sono importanti; queste sono alcune delle riviste più importanti scientifiche di anatomia patologica che hanno ovviamente un valore, l'"impact factor", che è la valutazione di quante citazioni un articolo ha e la somma degli articoli pubblicati da una certa rivista. Di queste, quella con un impact factor maggiore, di 7585, è il "Journal of Pathology", che una volta era la terza. Ora è la prima, da quando ha shiftato dalla patologia più applicata a quella più teorica. Ci sono delle riviste che hanno un impact factor maggiore perché sono più scientifiche di base e quindi hanno una coorte di lettori molto maggiore; il numero che si da all'impact factor comunque non è completamente sovrapponibile alla qualità.

La conoscenza delle fonti è fondamentale per evitare che l'aggiornamento venga fuori in modo piuttosto stravagante: questa è la descrizione di un recentissimo articolo (ultimo numero di "Science") che descrive il problema per cui stanno nascendo centinaia di riviste online (perché costa poco) che campano sulla pubblicazione di lavori in cui chi scrive paga una sorta di contributo alla pubblicazione. Anche per le riviste scientifiche più antiche, serie e sicure c'è il contributo per la stampa di foto; nel momento in cui è online i costi sono molto minori. In questo lavoro si descrivono una serie di problematiche legate al fatto per esempio che la maggior parte delle riviste editate a livello internazionale, dando un'idea di serietà, ha il centro economico in India. Sapete che gli indiani sono molto aggressivi dal punto di vista informatico: hanno inventato questo sistema di guadagno, ovvero creano delle riviste con titoli molto attendibili e l'unico problema è che i lavori su queste riviste sono poco attendibili. Su "Science" troviamo questa inchiesta che ha fatto questo furbone di giornalista: praticamente ha mandato centinaia di lavori tutti fatti di un unico lavoro finto, con nomi stravaganti, con errori clamorosi che con 600 dollari di contributi sono stati tutti pubblicati. Quindi nel momento in cui fate una ricerca online di informazioni scientifiche attenzione alle bufale e quindi sottolineo l'importanza di avere sempre un controllo sulle fonti.

Il problema non è solo sull'online; l'online ha dei costi così bassi che uno può creare delle riviste investendo poco e quindi se è un

truffatore le gestisce in modo irregolare. Il problema del cartaceo non è che non ci siano riviste cartacee o miste cartacee online che valgono poco, ovvio che ci sono, ma è calmierato dal costo di avere una rivista. Il messaggio che vi volevo trasmettere è: attenzione, abbiate critica intellettuale, fate una scelta di fonti attendibili. Il web ovviamente è assolutamente irrinunciabile perché lo usiamo tutti continuamente però ha tutta una serie di problematiche anche dove dei professionisti cercano di avere un controllo.

L'altra parte del mondo, quello non controllato, è veramente assurdo e demenziale e di esempi ne abbiamo tanti. Bisogna comunque tenerne conto perché quando sarete professionisti incontrerete un pubblico di pazienti o di potenziali pazienti sarete sempre più di fronte a quesiti, convincimenti, richieste dal paradossale all'assurdo al corretto, informazioni prese spesso con metodi web e non potrete semplicemente ignorarli ma dovremo gestirli e il contributo educativo sulla popolazione sarà sempre più difficile perché continuamente di fronte al medico si trovano persone che chiedono incessantemente un certo tipo di farmaco perché hanno letto, non solo gliene ha parlato la zia ma anche perché hanno l'hanno letto sul web ecc.

E quindi vi troverete di fronte alla gestione di tutta una serie di informazioni alcune della quali vere, altre false, molte travisate o esagerate dal momento che qualunque tipo di informazioni scientifica viene presa dalla riviste scientifiche e trasmesse dai media in modo sempre molto esasperato, esagerato (per esempio " a 15 anni scopre il test per il tumore del pancreas", vi risparmio i vari commenti, NdR).

Comunque vi sottolineo questo problema che poi sfocia anche nella dimensione politica o di gestione del consenso o di confiamento delle contraddizioni della medicina tradizionale che ha molte problematiche ma sicuramente non è così negativa come si vorrebbe affermare. Avrete sentito parlare di urinoterapia: molto conosciuta e credo molto poco praticata per ovvie ragioni ma sicuramente un fenomeno di questo tipo ha un ruolo significativo. Tutte informazioni quindi che debbono essere schiacciate su quanto conosciamo ora ma che devono evolversi; ma attenzione a cosa leggiamo, a cosa trasmettiamo e a come il pubblico interpreta le cose di cui parliamo anche perché poi c'è un lato oscuro di tutto ciò ovvero l'aumento di cause civili e penali contro i medici, quindi assicurazioni, medicina difensiva, aumento di spese che poi si ritorce sulla remunerazione dei medici.

Tornando alla scienza, l'evoluzione delle conoscenze come sappiamo viene poi sintetizzato in premi Nobel, riconoscimenti, carriere. L'anatomia patologica non ha molti Nobel, uno potrebbe essere quello di Golgi, un po' antico, perché in fondo la colorazione delle cellule nervose era un test istochimico applicato all'istologia e quindi importante per l'anatomia patologica (questa frase l'ho completata io, Ndr), uno molto importante è stato quello che hanno avuto Marshall e Warren non molti anni fa perché hanno dimostrato che gastriti e ulcere duodenali e tutta una serie di gravi malattie da un punto di vista epidemiologico era legata a un' infezione; l'unico modo che ha potuto usare il patologo dopo aver visto e descritto la presenza di *Helicobacter Pylori* nella mucosa gastrica con l'evidenza della patologia e del batterio è stato quello di bere *H. Pylori* e farsi quindi venire la gastrite per poi farsela passare con degli antibiotici. Dopo questa dimostrazione è stato preso in considerazione e ha avuto una grossa evoluzione tanto che il Nobel non ha premiato un lavoro gigantesco ma una scoperta, un passaggio importante delle conoscenze. Continua infatti l'evoluzione della medicina a essere un misto tra grandi investimenti, grande impiego di risorse per andare a studiare a livello molecolare la cellula insieme a osservazioni più modeste dal punto di vista dell'investimento economico ma in cui l'investimento maggiore è stato l'acume, il cervello, la volontà, l' andare avanti. Questo ve lo dico perché attualmente fare ricerca in Italia può sembrare un peso impossibile e inutile perché non abbiamo la possibilità di competere con Boston, Germania, Corea in quanto a investimenti ecc ma possiamo comunque sempre contribuire in modo notevole con tutta una serie di osservazioni, di ricerche a basso costo ma ad alto contributo intellettuale.

Se guardiamo la velocità della variazione dell'informazioni vediamo come L'Harrison del 2002 (il Nobel di Marshall e Warren era del 2005 ma la scoperta fu fatta molto prima) ancora non parla di *H. Pylori*. Quindi lo shift tra l'evoluzione delle conoscenze e la possibilità di insegnamento è un punto da sottolineare.

Entriamo più direttamente nella nostra materia, ematopatologia. In parallelo al prof Pizzolo, ovviamente da un punto di vista diverso, vediamo le stesse malattie. Nel senso che noi contribuiamo alla diagnostica e alla valutazione prognostica e predittiva delle malattie ematologiche, in alcune con una rilevanza maggiore, in altre minore. Riguardo alle anemie, su tutto ciò che laboristicamente è evidenziabile a livello di siero, di sangue periferico abbiamo poco da dire ovviamente. Ma nel momento in cui la diagnosi preveda l'analisi di un tessuto da un punto di vista operativo e diagnostico l'istologia è rilevante insieme alle sue molecole e metodiche complementari per affinare la precisione della diagnosi.

L'ematologia è stata la prima in cui queste metodiche sono state applicate e quindi è stata quella che per più tempo ne ha beneficiato e quindi è quella più matura attualmente rispetto a classificazione e utilizzo diagnostico.

Il fine, ricordatevelo sempre, è quello di cercare di alleviare il più possibile la malattia, dalla guarigione totale se possibile fino alla semplice palliazione delle sofferenze con un criterio guida importantissimo che è quello di non aumentare la negatività che già la malattia arreca a un paziente con manovre, farmaci, processi diagnostici invasivi non utili ed efficaci. Quindi quello che si fa al paziente per il suo bene deve essere calibrato esattamente con quello che inevitabilmente si fa di male. Il processo diagnostico istologico che prevede la necessità di avere un prelievo invasivo obbliga il clinico e il patologo al massimo livello di attenzione, di valutazione della complessità del processo nella sua globalità con il fine della massima efficacia evitando così qualsiasi tipo di inutile manovra. Quando serve, invece, l'essere troppo pietosi ovviamente non può che portare male.

Il prodotto quindi è l'informazione diagnostica: la biopsia deve essere preceduta da uno studio accurato della situazione, dalla scelta di tutta una serie di test non invasivi che evidenzino la possibilità di arrivare alla diagnosi senza produrre il danno, come rischio, come costi in termini economici e biologici per il paziente.

Un esempio tipico è quello della linfadenopatia: ovvero un linfonodo che si ingrandisce in una persona di 60 anni, 30, un bambino, a seconda dell'età può avere un significato diverso. In un giovane ovviamente i test sierologici per le infezioni e tutta una serie di valutazioni devono per forza precedere il test invasivo e sono assolutamente necessarie. Diversi anni fa diagnosticavamo con una bassa ma esagerata frequenza una infezione virale di tipo mononucleosico in presenza di una

linfadenopatia; ovviamente è una malpractice, nel senso che può capitare ma deve essere rarissimo diagnosticare una infezione mononucleosica su una biopsia linfonodale. Attualmente non esiste più il problema perché evidentemente i processi e le flow chart diagnostiche sono arrivate ad un livello di completezza e raffinatezza sufficienti per evitare queste esagerazioni. (questo ultimo discorso è un po' contorno, riporto esattamente quanto detto, NdR)

Il livello di challenge del patologo rispetto all'esame istologico è quello per cui il livello di scelta e decisione può essere piuttosto severo: non so quanti di voi conoscano i funghi del bosco ma nel momento in cui io scelgo, do in cucina un fungo velenoso piuttosto che lo champignon faccio un grave errore! Su quale criterio di scelta, su quale valutazione vi basereste? Quello morfologico! Quindi quelli che vanno a funghi si basano sulla morfologia per riconoscere e scegliere, rischiando la vita propria e dei familiari in caso di errore. Nel momento in cui andiamo a valutare da un punto di vista morfologico sia macroscopico che microscopico una lesione non è che siamo dei fungaroli ma il criterio di primo approccio è lo stesso. Per esempio il dermatologo vede un nevo e in base alla morfologia lo definisce come rischioso, melanoma, o meno. Fa questa decisione in base appunto alla morfologia, ovvero in base a quante cellule ci sono, dove sono, come sono distribuite, se infiltrano l'epidermide o meno e cos' via. Ci sono tutta una serie di criteri morfologici che ci permettono di diagnosticare il significato di una lesione al microscopio. Questo ovviamente non è sufficiente e si sono sviluppate tutta una serie di metodologie che sono importanti perché aumentano la precisione e la sensibilità nel riconoscimento ma anche perché si è visto negli anni che contribuiscono a dare tutta una serie di informazioni molto importanti dal punto di vista della comprensione della patogenesi della malattia.

Prendiamo per esempio la **sequenza nevo-melanoma**: i nevi sono degli accumuli di cellule melaniche considerati per definizione benigne; sono chiaramente delle cellule che hanno un vantaggio per quanto riguarda la sopravvivenza e la proliferazione, o più che proliferazione, di non regolazione corretta dell'apoptosi rispetto alla proliferazione per cui si accumulano. Lo studio dei fattori che regolano il ciclo cellulare ha evidenziato che nelle cellule nevice si accumulano dei marcatori, delle proteine, che sono degli inibitori del ciclo cellulare; questi inibitori sono definiti da dei numeri seguiti dalla lettera "p" di proteina (il numero è legato più o meno al peso molecolare) e i principali sono p21, p16, p53. Questi inibitori determinano lo stato G0 della cellula essendo dei forti inibitori del ciclo cellulare. Le cellule nevice più recentemente sono state portatrici in numerose lesioni benigne melaniche di una mutazione nell'oncogene BRAF, una particolare mutazione, V600, che dimostra che la proliferazione è clonale ed è "neoplastica" anche se con scarsa aggressività. Questa scarsa aggressività è legata al fatto che sono caratterizzate da un accumulo di inibitori del ciclo cellulare che sono legate ad un fenomeno descritto negli ultimi due decenni sempre più in dettaglio: **induzione della senescenza cellulare su stimolo oncogenico**, ovvero la mutazione di BRAF mette le cellule nevice in condizioni di attivare il blocco proliferativo con accumulo di questi inibitori di ciclo cellulare.

La cosa interessante è che gli inibitori dell'oncogene nel melanoma sono dei farmaci in studio che specificatamente inibiscono la funzione chinasi indotta dall'oncogene e sono importanti fattori terapeutici di tipo biologico per il melanoma; se andate a guardare i siti (io preferisco mostrarvi i siti pubblici anche per evidenziare il fatto che sono informazioni di dominio pubblico mentre quelle che abbiamo noi sono più importanti e più specifiche ma spesso possono sfuggire) vedete la netta differenza tra le immagini che evidenziano le lesioni prima della cura e dopo. Il problema è che non tutti i pazienti hanno questo tipo di devastanti lesioni neoplastiche e non tutti rispondono in questo modo ma nel momento in cui il pubblico si abitua a questo tipo di "miracolo" ovviamente può esserci un problema nel gestire l'utilizzo di un farmaco.

Sequenza semplicissima: il nevo è controllato dalla senescenza cellulare indotta dall'oncogene, nel momento in cui questa viene persa perché abbiamo per esempio una delezione, una perdita dell'attività del gene che produce la p16, il nevo diventa melanoma. La sequenza nevo- melanoma BRAF è un gruppo importante di melanomi; c'è un altro gruppo, indipendente dalla mutazione del BRAF, che quindi non risponderà a questo tipo di terapia. Introduciamo quindi a questo punto il concetto di **PREDITTIVITA'**, predittività che è legata alla diagnosi (melanoma) ma soprattutto alla terapia: la presenza o meno di una determinata lesione molecolare mi dice se posso usare o no un determinato farmaco. E quindi il nostro mondo di patologi è stato implementato dalla necessità di studiare e conoscere tutta una serie di pathway molecolari, che una volta conoscevano solo i patologi, perché sono diventati una routine quotidiana nell'individuare, anche a livello molecolare con varie metodiche, la presenza o l' assenza di particolari marcatori che ci danno la possibilità di fare valutazioni predittive che sempre più ci sono richieste. Per esempio un inibitore del BRAF, il vemurafenib ("-ib" sta per inibitore).

Quindi vediamo come tra i nevi, i nei che tutti noi abbiamo, molti siano dei tumori clonali, non solo delle semplici alterazioni morfologiche: vanno quindi monitorati, bisogna fare la mappa, stare attenti perché qualcuno può diventare pericoloso.

Meccanismo della senescenza cellulare: è un meccanismo generale della biologia e della medicina che caratterizza potenzialmente tutti i tessuti e gli organi e le cellule; alcuni tipi di cellule rispondono alla senescenza cellulare con un meccanismo di secrezione e alterazione del microambiente molto notevole e altri semplicemente con un blocco della proliferazione. E' un meccanismo biologicamente correlato al tentativo, spesso con successo, di bloccare sul nascere le neoplasie. La senescenza è causata dall'attivazione di alcuni oncogeni, BRAF è uno particolarmente efficace ma non solo; la senescenza cellulare è, oltre che dagli oncogeni, prodotta anche da tutta una serie di meccanismi di cui il più fisiologico è l'erosione telomerica legata alla proliferazione per cui ad ogni ciclo replicativo della cellula questi si accorciano (paragona i telomeri ai vecchi skipass: ad ogni giro veniva fatto un buco in più fino ad esaurirsi le risalite disponibili, ho rielaborato un po' Ndr). Alcuni meccanismi possono accelerare la senescenza accelerando l'erosione telomerica: lo stress cellulare, il danno al DNA (p53 è qui molto importante).

Ovviamente la senescenza cellulare è geneticamente determinata: per cui ci sono soggetti che geneticamente hanno la possibilità, o perché hanno telomeri più lunghi o perché comunque meno soggetti all'erosione o perché hanno meccanismi di allungamento più efficaci (cellule staminali) ,per motivi genetici quindi, di arrivare a 100 anni come Priebke; altri invece, meno dotati, hanno delle speranze di vita più brevi.

Chiaramente anche delle condizioni esterne possono contribuire a questo tipo di accorciamento anomalo della speranza di vita della cellula, tra cui il fumo di sigaretta e gli ossidanti in generale che sono dei fortissimi invecchiatori, per cui chi fuma ha la pelle precocemente rovinata, patologie ai denti, alle gengive, agli organi.. Per cui uno degli effetti del fumo, dell'inquinamento,

degli stress chimici ma non solo, anche le radiazioni solari sono forti induttori di senescenza cellulare precoce, oltre che all'attivazione oncogenica porta anche a questo meccanismo di inibizione della proliferazione.

Il tessuto in cui la componente replicativa è meno efficace invecchierà prima perché ha meno possibilità di rinnovo; la controparte è che sarà meno soggetta a tumori? NO! Perché gli stessi fattori che provocano l'invecchiamento possono, nel loro danneggiamento del DNA, provocare anche alterazioni oncogeniche. Quindi è tutta una serie di circuiti tra loro correlati che convergono su questo meccanismo non molto noto ma attualmente di grande successo nella biologia e nella medicina che è la senescenza indotta da oncogeni in cui le molecole principi sono gli induttori del blocco cellulare: p16, Rb, p53.

La mutazione del V600 di BRAF è individuabile con metodologie molecolari: si fa un sequenziamento del DNA e si va a cercare la mutazione. In alternativa esistono degli anticorpi monoclonali, recentemente messi a disposizione, che riconoscono l'epitopo legato alla mutazione della proteina ed è quindi è possibile dimostrare la mutazione a livello della lesione e quindi in istologia. Quindi nel momento in cui si debba fare una predittività su un melanoma per la presenza o assenza del BRAF il test più indicato è quello della mutazione ma si può semplificare e abbattere i costi con la dimostrazione della mutazione con l'anticorpo.

E' interessante, e lo vedremo più avanti, come la stessa mutazione dello stesso oncogene sia dimostrato in due malattie oncologiche in ematologia: 1) Hairy cell leukemia: processo linfoproliferativo B a basso grado; la presenza della mutazione è stata dimostrata un anno fa da un consorzio di ricercatori italiani e vi ha partecipato anche un gruppo di ricercatori dell'università di Verona. Quindi vista l'analogia di mutazione è potenzialmente utilizzabile la stessa terapia, anche se probabilmente non ce ne sarà bisogno, ma comunque dal punto di vista biologico e di definizione della patogenesi è un dato molto importante. 2) Istiocitosi a cellule di Langerhans: un processo proliferativo che vede come controparte normale della neoplasia la cellula dendridica cutanea detta cellula di Langerhans.

Quindi l'inquadramento della funzione del patologo, a parte le autopsie che abbiamo visto essere in netta diminuzione, abbiamo che il grosso del lavoro è di tipo morfologico ma che vede un importante ampliamento di tipo molecolare, immunofenotipico ecc, ovvero di metodologie di tipo non puramente morfologico; questo vede anche un aumento delle applicazioni nel prelievo: nei campi della citologia agoaspirativa il radiologo e il patologo contribuiscono al prelievo citologico con diagnosi immediata in site. Quindi tutta una serie di differenziazioni della professione che ovviamente come tutte le altre specialità segue l'evoluzione delle conoscenze.

Le alterazioni molecolari possono colpire diversi tipi di cellule a diverso livello, spesso a livello di cellula staminale o di cellula committed, che ha però ancora una potenzialità evolutiva e differenziativa. A seconda del livello di maturazione o di differenziazione raggiunto dalla cellula quando avviene la mutazione si stabiliscono le caratteristiche di aggressività biologica e di fenotipo; quindi la mutazione del BRAF se avviene su una cellula nevica produce un nevo e potenzialmente un melanoma; nella hairy cell leukemia questa avviene su una cellula B matura e questo può produrre un vantaggio non di proliferazione ma piuttosto nell'equilibrio proliferazione/apoptosi, blocco del ciclo che porta alla malattia.

E' interessante e importante però capire che il farmaco che può bloccare un certo tipo di anomalia molecolare può essere usato in varie malattie se la mutazione è la stessa.

Quindi il nostro prodotto dal punto di vista operativo è un misto tra l'interventismo diagnostico come servizio a livello della vita (?! NdR) all'ospedale ma anche di studio e di conoscenze di lenta evoluzione e applicazione insieme alle conoscenze che acquisiamo dalla parte scientifica internazionale che non sia il miracolistico web ma i dati accumulati, provati e validati con evidenza scientifica secondo dei criteri in cui per altro possono sovrapporsi delle spinte e delle derive o dei bias di successo legati all'informazione che danno i media.

Per cui ci possono essere degli investimenti in medicina non particolarmente corretti dal punto di vista dell'equilibrio delle varie patologie e sulla locazione delle risorse ma spinte e legate alla trasmissione di informazione in modo scorretto mediante il web, i giornali, la politica ecc..

Quindi i compiti che dobbiamo eseguire sono: la diagnosi delle malattie, la identificazione di gruppi prognostici, la valutazione predittiva dell'efficacia di diversi farmaci ovviamente seguendo delle linee guida e delle flow chart ben codificate.

Passiamo quindi al concetto di terapia su misura per cui il paziente, per esempio, che ha il carcinoma del colon in cui non si dimostri la mutazione del k-ras (altro oncogene che porta fuori dall'utilizzazione del farmaco secondo le linee guida nazionali e nei pazienti che la presentano non può essere applicata una terapia con gli inibitori del EGFR perché si è visto da questi studi che quando si ha la mutazione di k-ras l'EGFR non fa nulla!) e lo stesso nel carcinoma del polmone: la possibilità di somministrazione di un farmaco costoso che inibisce l' EGFR può essere somministrato solamente se si dimostrano mutazioni a livello dell' EGFR. Torniamo quindi al concetto della predittività. (Ho cercato di renderlo il più chiaro possibile ma sinceramente non ho ben capito neanche io se sia corretto così come l'ho scritto, NdR)

ANTICORPI: voi sapete dall'immunologia come sono, come sono fatti (il professore sottolinea come non si debbano dimenticare queste cose); siamo sempre di fronte agli anticorpi in qualunque tipo di malattia, test diagnostici.. sono quindi delle molecole piuttosto importanti da conoscere e ricordare bene. Dal laboratorio, dalla patogenesi delle malattie immuni sono passati a essere farmaci, in particolare gli anticorpi monoclonali cosiddetti "umanizzati". L'anti CD20, come detto dal professor Pizzolo, è stato uno dei primi esempi di anticorpo monoclonale umanizzato con un relevantissimo ruolo farmacologico in campo ematologico: ha cambiato proprio l'approccio terapeutico alle proliferazioni a cellule B. Un altro esempio importante è l' "Herceptin", cioè

l'anticorpo umanizzato contro Her2 nel carcinoma della mammella che è stato un altro importantissimo esempio che ha fatto scuola per cui in molti altri campi dell' oncologia l'utilizzo di questi farmaci è diventato importantissimo. Riguardo agli anticorpi monoclonali dovrete sapere cosa sono, come si fanno, come si differenzano da quelli policlonali, quali sono le loro caratteristiche e sapere la descrizione della metodologia che ha portato alla individuazione della possibilità di avere anticorpi monoclonali ha giustificato il Nobel agli individuatori, Köhler e Milstein, degli anticorpi monoclonali. In terapia gli anticorpi monoclonali possono essere quelli di topo, che usiamo come reagenti di laboratorio in anatomia patologica, possono essere chimerici, umanizzati o totalmente human e l'evoluzione dell'uso degli anticorpi monoclonali in terapia ha seguito una diminuzione della componente animale degli anticorpi aumentando la componente umana che sappiamo essere comune a tutte le immunoglobuline indipendentemente dagli individui e quindi capaci di non sviluppare reazioni immunitarie avverse e quindi con la possibilità che il farmaco permanga a lungo e faccia il suo lavoro nell'organismo nel combattere il tumore grazie ad una diminuzione della immunogenità. I suffissi -ximab, -zumab, -umab fanno capire immediatamente il tipo anticorpo.

Come dicevo prima, l' herceptin è uno dei primi esempi di applicazione di un anticorpo monoclonale umanizzato in oncologia usato nel carcinoma della mammella. La predittività richiesta è quella di individuare i pazienti che avranno un beneficio dal farmaco mentre quelli che non hanno una patogenesi legata all'amplificazione del gene Her2 non avranno alcun beneficio ma anzi ne avranno un danno perché comunque l' anticorpo produce degli effetti collaterali oltre ad avere un costo molto elevato. La predittività è quindi fondamentale. Per il carcinoma della mammella, per garantire la massima efficacia si è individuato a livello internazionale una flow chart operativa in cui il tumore viene valutato in base all'espressione della proteina Her2 con metodo immunofenotipico che può essere valutato anche a livello di FISH (ibridazione in situ con fluorescenza che praticamente permette di fare una citogenetica in interfase su sezioni utilizzando le stesse sezioni istologiche) in cui si dimostra l'amplificazione del gene Her2 e quindi la possibilità che l'anticorpo contro Her2 inibisca il vantaggio proliferativo. Se non dimostra questa amplificazione non può essere dato il farmaco; quindi il nostro delicato compito è sì quello di diagnosticare il carcinoma alla mammella escludendo delle lesioni simili dal punto di vista morfologico ma anche di dimostrare la presenza dell' amplificazione per permettere all' oncologo di dare o meno il farmaco specifico. Ovviamente le metodologie devono essere fatte bene, validate, avere un controllo di qualità, una efficacia della definizione preventiva. La predittività in praticamente tutti i campi dell' oncologia; l'evoluzione adesso è quella di fare dei profili genici ovvero dei profili che analizzano l'espressione genica di centinaia di geni contemporaneamente (andando quindi a studiare l'RNA) andando a vedere se ci sono delle differenze di espressione di tutte questi geni che correlino con dati prognostici significativi o che individuino dei potenziali target molecolari da studiare per trovare dei nuovi farmaci. Con queste metodiche sono state individuate numerose anomalie di espressione significative che hanno prodotto dei marker diagnostici ma anche l'individuazione di anomalie correlate a prognosi, per esempio nella leucemia linfatica cronica il gene profiling ha dimostrato come un enzima, ZAP70, legato alla differenziazione T ma non solo, sia un forte marker prognostico. Per cui la suddivisione delle leucemie linfatiche croniche in gruppi a buona o pessima prognosi o sono attualmente effettuabili con test semplificati o molecolari per l'individuazione di alcune caratteristiche che legano il gene arrangement della cellula B neoplastica allo stadio prefollicolare o postfollicolare ma molto più semplicemente con un test immunohistologico che dimostri le iperespressioni dello ZAP70. Questo test che oggi ci chiedono costantemente è stato individuato grazie all'utilizzazione in ricerca del gene profiling che ha dimostrato questo tipo di caratteristica. Gli esempi sono tantissimi: per voi sono esempi, per noi sono l'incremento della professionalità e il raggiungimento di livelli di competenza con quello che serve. Quindi aggiornamento costante seguendo il clinico, le sue esigenze, la progressione dei farmaci, la disponibilità di dati predittivi e prognostici e, da parte nostra, la possibilità di fornirglieli.

Quindi le terapie biologiche che sono sempre più importanti e frequenti sono caratterizzate dalla lenta e progressiva acquisizione di dati, prima sulla patogenesi poi di marker diagnostici, poi la disponibilità di farmaci, la loro validazione, il perfezionamento e così via.

Una delle prime importantissime acquisizioni è stata la possibilità di usare il Gleevec (Imatinib) nella leucemia mieloide cronica: importante sia perché ha sostanzialmente portato una cura a questa frequente malattia anche migliorando la qualità della vita ma anche perché rappresenta un esempio fondamentale dell'applicazione delle terapie biologiche. La scoperta del meccanismo molecolare alla base della patologia risale circa al 1996 se noi andiamo a vedere l'ultimo medline (?!? Ndr); quindi vediamo come non sia poi troppo tempo fa e come l'evoluzione sia molto rapida. Ce ne sono di diverse varianti. In America questi farmaci sono molto pubblicizzati e vendibili, sono alla disponibilità del grande pubblico mentre da noi sono somministrati solo a livello ospedaliero.

Questi farmaci, Gleevec in particolare (nato per la leucemia mieloide cronica), con l'approfondimento della comprensione dei meccanismi ha portato alla dimostrazione che anche altri tumori possono avere risposte allo stesso farmaco anche se l'alterazione non è su bcr-abl ma su altri recettori tirosin chinasi come il c-kit, un recettore molto importante nelle cellule staminali non solo ematologiche in cui il meccanismo recettoriale ha delle similitudini con quello sensibile a Gleevec. Un esempio di un tumore di questo tipo è il GIST: un importante tumore gastroenterico stromale (gastrointestinal stromal tumor) noto, abbastanza frequente, di solito a bassa malignità ma che può avere delle aggressività maggiori; è un tumore che quando evolve nelle sue forme più aggressive può dare dei seri problemi, anche letali, nei pazienti (commenta un vetrino di una porzione di tubo gastrointestinale con un GIST- la parte marrone è la dimostrazione diagnostica dell'espressione del c kit o CD117). In questo tumore si ha una mutazione sull'esone 11 che rende il recettore irresponsivo alla regolazione fosforilasi: Gleevec qui blocca la tasca dell' ATP come nella leucemia mieloide cronica e anche se il recettore è diverso funziona. Questa è stata la prima evidenza di funzionamento di un inibitore di nuova generazione in una neoplasia solida.

Il GIST, lo vedrete con il professor Zamboni, è una neoplasia mesenchimale, una "distinct entity" ovvero una entità nosografica (vediamo ancora una volta l'importanza delle classificazioni) che colpisce con diversa frequenza vari tratti dell'apparato gastrointestinale con prevalenza allo stomaco; può avere morfologie diverse e la dimostrazione del c-kit è fondamentale per la sua diagnosi.

In tutti i campi dell'oncologia però il trend è: comprensione dell'eterogeneità e quindi classificazioni sempre più raffinate e legate a entità nosografiche diverse e non più identificate solo dal punto di vista morfologico ma anche da quello molecolare perché la presenza o assenza di particolari alterazioni è il grimaldello per poter usare farmaci biologici molto specifici e potenti per poter interferire con le anomalie e il vantaggio proliferativo del processo neoplastico e controllare per quanto possibile la proliferazione neoplastica. In alcuni casi il farmaco è molto efficace mentre in altri casi meno (continua con "come nel carcinoma del polmone" ma poi continua la frase in un modo che non ha alcun senso, NdR). I farmaci biologici applicati portano a dei miglioramenti della storia clinica della malattia, in alcuni casi molto evidenti, per esempio con mutazioni del oncogene ALK; ALK è un gene alterato per traslocazione in molti linfomi T, molto particolare, che dobbiamo conoscere bene sia per la sua storia che per le sue caratteristiche patologiche e la rilevanza clinica in ematologia che sottolinea ancora come un coinvolgimento degli stessi oncogeni possa avere un significato potenzialmente legato alla terapia.

Anche nel carcinoma del polmone, a frequenze basse, possiamo avere la mutazione del BRAF sempre V600. Quindi medicina predittiva con applicazioni in campo terapeutico.

Nelle "pipeline", ovvero quello che prospettano le compagnie farmaceutiche per solleticare gli investitori, si hanno centinaia di potenziali molecole, meccanismi patogenetici, farmaci in studio a livelli diversi (cellulare, con modelli murini, già in trial clinici...). Per esempio trial per il melanoma con alterazioni del BRAF, alterazioni del MET nel carcinoma del polmone..

Ci sono quindi molte cose che cambieranno ma bisogna tra le altre cose anche tenere conto del costo esorbitante di questi farmaci: ne parlano anche i media di quanto questi farmaci siano sì efficaci (mostra un articolo dell'Espresso del 2009) ma chiediamoci il loro significato; "quanto vale una vita", non umana chiaramente, ma per esempio un costo molto elevato per un overall survival di 1,2 mesi è una cosa di cui si deve tenere conto e di cui bisogna discutere. Ci sono dei farmaci che aumentano la sopravvivenza dal 20 all'80%, ci sono quindi dei grossi benefici come per esempio in ematologia, e la predittività rende molto più attendibile e certa utilità di particolari farmaci. Siamo però ancora all'inizio di un processo di evoluzione che porterà a un miglioramento progressivo ma l'investimento dobbiamo farlo ora, con il problema che siamo tutti un po' in crisi! Per esempio, come mi diceva il professor Tortora, in Grecia è stato bloccato l'utilizzo di questi farmaci e la curva di sopravvivenza, almeno in oncologia, sta già cominciando a calare.

Le **metodiche** che utilizziamo sono tutte applicabili a tessuti e le suddiviamo in: tecniche morfomolecolari e tecniche di biologia molecolare; la differenza è che le prime mantengono il connotato morfologico, per cui la FISH per esempio ha bisogno di vedere i nuclei, così come l'immunoistochimica e l'immunoistologia hanno una forte valenza morfologica. Nella seconda invece il tessuto viene distrutto per estrarre gli acidi nucleici, le proteine per il Western Blotting ecc.. e si ottengono dei dati non in competizione ma in complementarità con quelli ottenuti dalle tecniche morfomolecolari. Essenzialmente la biologia molecolare è molto evidente nell'individuare mutazioni, la FISH per le amplificazioni e le traslocazioni, l'immunoistochimica (a più basso costo e a maggior numero di applicazioni) è fondamentale per l'analisi proteica: gli anticorpi sono sonde che riconoscono e si fa una proteomica sul tessuto e si possono riconoscere con molta precisione popolazioni cellulari e atipie assegnando particolari tipi di espressioni geniche che sono correlabili ad alterazioni molecolari o livelli di differenziazione. Per esempio le leucemie linfoblastiche hanno sì caratteristiche morfologiche distintive ma mostrano anche la presenza o meno di particolari marker di tipo molecolare che indirizzano a linea T, B o che siano indice di immaturità, per esempio la Tdt.

Quindi riassumendo le metodologie che utilizziamo in particolare in ematologia e in oncologia in particolare sono: biologia molecolare, morfologia molecolare, immunoistochimica, FISH e in parte anche la citometria. Dobbiamo sapere che queste metodiche ci sono, che evolvono e continuamente dovranno essere professionalmente conosciute nel momento in cui diventiate diretti utilizzatori terminali di questo tipo di analisi.

Lezione di Anatomia Patologica del 24/10/2013 (1)

Lezione di Anatomia Patologica del 24/10/2013 **Professor Chilosì Sbobinatrice : Elena**

Reffo

Revisore: Alessandro Civettini

(prosegue la trattazione delle metodologie iniziata nella lezione precedente) Le metodologie utilizzate in Anatomia Patologica, e in particolare in Ematopatologia, servono per dare una definizione precisa della diagnosi e per non incorrere in errore. Possiamo suddividere le metodologie in:

- Morfologia
- Citologia
- Istologia
- Analisi molecolare

L'**Analisi Molecolare** può essere a sua volta suddivisa in:

- **Morfologia molecolare**: in essa il "dettaglio morfologico" resta una dimensione importante del processo analitico, per cui il tessuto viene conservato. La sezione istologica viene osservata e utilizzata come dimensione analitica per il riconoscimento di atipie cellulari, insieme all'espressione di particolari proteine o alla presenza di particolari segnali, rilevati utilizzando per esempio sonde e acidi nucleici (*rielaborazione, le parole del prof sono queste: "Il concetto di sezione istologica, di riconoscimento di atipie cellulari, viene osservato e utilizzato come dimensione analitica insieme all'espressione di particolari proteine o la presenza di particolari segnali, per esempio il fish, utilizzando sonde, acidi nucleici e così via" NdR*).

- **Biologia molecolare:** in essa si ha la distruzione del tessuto e quindi del contesto morfologico, al fine di estrarre gli acidi nucleici, per fare l'analisi d'espressione, utilizzando l'RNA o il DNA per mutazioni o altre alterazioni di questo tipo;

All'interno della **Morfologia Molecolare** abbiamo diversi tipi di analisi: citochimica e istochimica, termini utilizzati per indicare l'analisi di attività enzimatiche. La citochimica enzimatica è stata una delle metodologie più utilizzate molte anni fa in ematologia, mentre ora si usa molto meno. Tuttavia per alcuni test è ancora utilizzata, per esempio quello per il ferro emosiderinico, che serve per definire l'anomalia di accumulo di emosiderina nei mitocondri degli eritroblasti, che indica un particolare tipo di mielodisplasia: si testa la presenza di ferro emosiderinico con particolari reagenti sullo striscio di sangue midollare. L'accumulo di emosiderina nei mitocondri degli eritroblasti, che si chiameranno sideroblasti, è il marcatore. L'immunoistologia è molto utilizzata per definire il profilo immunofenotipico delle cellule sospette o neoplastiche ed è un test, effettuato di routine, che l'ematologo deve saper leggere come referto, sia perché anche lui è un citologo e immunologo diagnosta sul sangue periferico e sul midollo, sia perché deve saper interpretare i referti dal punto di vista diagnostico. Le metodologie sono molte ma tutte queste si basano sull'utilizzo di anticorpi come sonde (la sonda è quel qualcosa che utilizziamo nell'analisi per verificare e quantificare la presenza di qualcosa). Tali anticorpi, che sono preparati apposta per la diagnostica, sono monoclonali e di topo (*consiglia di studiare le caratteristiche, le metodologie e il significato degli anticorpi monoclonali, NdR*). Vengono utilizzate queste sonde con varie metodiche di rivelazione che possono essere:

- **Immunoenzimatica:** utilizza come rivelatore di affinità del sistema, e quindi come elemento che dimostra la presenza di un antigene quando si lega alla cellula, il prodotto della reazione perossidasi diaminobenzidina ossigenata che produce un precipitato bruno-marrone, che è quello che si vede normalmente nei preparati, che significa che si è accumulato il prodotto di una reazione anticorpo-sonda che si è legata, attaccato a un sistema che fa precipitare un cromogeno. Ovviamente ci sono varianti metodologiche, reagenti più o meno sensibili (che sono per noi di non particolare interesse);

- **Immunofluorescenza:** in essa l'anticorpo, quindi la sonda, viene evidenziato mediante il legame con un fluorocromo, cioè una molecola che, esposta ai raggi ultravioletti, viene eccitata (e quindi gli elettroni vengono allontanati dagli orbitali) rilasciando energia nel campo del visibile.

Citometria di flusso (*il prof dice di ripassare i meccanismi di funzionamento, come si leggono i grafici, il significato, i meccanismi di utilizzazione in laboratorio, NdR*) In questa metodologia vengono utilizzate cellule in sospensione, quindi vive, ottenute dal midollo o da sangue periferico o più raramente da sospensione di tessuti, per esempio i linfonodi. Permette di individuare con una elevata sensibilità e precisione delle popolazioni cellulari, che vengono individuate grazie alle loro caratteristiche fisiche di scatter, larghezza, capacità di assorbire l'energia del laser che le attraversa, ed inoltre si possono fare anche delle valutazioni molto precise sui fenotipi di queste particolari popolazioni. (*Rielaborazione, le parole del prof sono queste: "E' utile perché può contribuire su cellule in sospensione, quindi vive, ottenute dal midollo o da sangue periferico, o più raramente da sospensione di tessuti per esempio i linfonodi, e può contribuire con una elevata sensibilità e precisione ad individuare delle popolazioni cellulari, individuate per le caratteristiche fisiche di scatter ??, larghezza, capacità di assorbire l'energia del laser che le attraversa, ma si possono fare anche fare delle valutazioni molto precise su fenotipi collegabili a queste particolari popolazioni"*).

Per esempio con questa metodologia può essere effettuata la rilevazione di popolazioni clonali B mediante l'analisi di catene leggere kappa e lambda delle immunoglobuline, quindi si vanno a rilevare le catene di superficie. Le immunoglobuline legate alla membrana sono i B cell receptor, i quali possono avere k o lambda, con una distribuzione di circa 2:1 o 3:1 a favore delle kappa. Nel momento in cui troviamo un valore di 5:1 a favore lambda, o solo lambda o solo kappa, è un indice molto attendibile di clonalità, cioè ci indica che quella popolazione è clonale. La stessa analisi si può fare anche sul linfonodo incluso in paraffina, con il preparato istologico tradizionale, ma la sensibilità è molto minore. Infatti le immunoglobuline di membrana non si riescono a dimostrare con attendibilità sufficiente. Si può peraltro dimostrare sulla paraffina la clonalità delle cellule B differenziate in senso preplasmacellulare, immunoblasti linfoplasmacitoidi che stanno per diventare plasmacellule, cioè quando la cellula B maturando comincia a produrre immunoglobuline e ad accumularle nel citoplasma prima di buttarle fuoricome fisiologicamente è utile per accumulare anticorpi nel siero. Quelli di membrana invece hanno un significato recettoriale. Quindi questa differenza di localizzazione di quantità di immunoglobuline sulla membrana e sul citoplasma è alla base di diversi tipi di analisi di clonalità. L'analisi di clonalità è molto importante perché in casi dubbi o borderline la clonalità ci spinge parecchio verso l'interpretazione di una popolazione come neoplastica per quanto riguarda i linfociti B.

Con la citometria di flusso si può fare una valutazione quantitativa e qualitativa molto accurata delle popolazioni T e B, con una serie di marcatori utili per la definizione delle popolazioni linfoidi che abbiamo in osservazione. (*il prof mostra tre esempi di grafici di citometria di flusso, le slide non sono ancora disponibili, aggiungo tra parentesi, all'inizio di ogni punto, una spiegazione del grafico, NdR*) Le nuvole rosse nei grafici sono le popolazioni, le singole cellule passate davanti al laser che colpisce il fluorocromo e trasforma l'energia dal segnale al computer, e dà questi grafici:

- (*in ascissa CD20, in ordinata lambda*) la popolazione a sinistra in basso è negativa sia per CD20 che per lambda (di fianco a cd20 vi è una sigla, "FITC", che significa fluoresceina, il colorante più utilizzato, insieme ad altri, in citometria di flusso); la popolazione a destra in basso è formata da cellule che esprimono CD20, che è il marker delle cellule B, e quindi sono B; sopra a quest'ultima, in alto a destra, vediamo un'altra popolazione positiva sia per CD20 che per lambda;

- (*in ascissa CD20, in ordinata kappa*) in alto a destra vi è una grossa popolazione positiva sia per CD20 che per kappa, in basso a destra vi è una popolazione che esprime kappa e non lambda (*credo intendesse che esprime CD20 e non kappa, dato che nel grafico non vi è lambda, NdR*) e quindi clonalità, quindi ho l'informazione che c'è una popolazione clonale e quindi linfomatosa;

- (*in ascissa CD7, in ordinata CD5*) è lo stesso per quanto riguarda la tipizzazione dei linfociti T, vi sono vari marker, per esempio CD2 CD3 CD5 CD7. In questo caso abbiamo una popolazione in alto a sinistra che esprime CD5 e non CD7, mentre quella in alto a destra esprime CD5 e CD7. La perdita di un marcatore delle cellule T è associabile a una popolazione clonale neoplastica e quindi vedere questo indica che molto probabilmente c'è un linfoma T. Non basta, ma è un'informazione importante.

FISH Le metodiche di ibridazione in situ non usano come sonde gli anticorpi bensì gli acidi nucleici, anche questi coniugati in modo da dare fluorescenza, per permetterci di seguire la sonda nel tessuto. Serve per dimostrare anomalie di tipo citogenetico, quindi per esempio amplificazioni geniche che daranno iperespressione di particolari proteine, oppure traslocazioni, o perdite o guadagni di particolari loci e frammenti cromosomici importanti per la definizione di anomalie molecolari collegate a particolari entità neoplastiche. È una metodologia particolarmente utile in ematopatologia. Si usano sonde per diversi loci, coniugate con fluorocromi diversi (i nuclei in interfase si trattano in particolari modi) e si va ad analizzare la distribuzione dei segnali verdi e rossi con particolari interpretazioni legate a metodi diversi, usando sonde diverse (*frase non chiara, NdR*). Per esempio, la traslocazione t(11;14) è molto importante dal punto di vista molecolare perché è l'alterazione che dà il vantaggio proliferativo nel linfoma a cellule a mantelo. Questa traslocazione mette il gene che codifica per la ciclina D1, che si trova sul cromosoma 11, sotto il controllo del promotore del gene delle immunoglobuline, che si trova sul cromosoma 14. Questa traslocazione altera il controllo dell'espressione del gene per la ciclina D1, per cui viene espresso in modo incontrollato; quindi c'è un'iperespressione di ciclina nelle cellule B, la ciclina stimola il ciclo cellulare, aumenta la proliferazione e dà il vantaggio che è alla base della trasformazione neoplastica. (*Il prof mostra una tabella in cui vi sono una serie di traslocazioni cromosomiche associate a neoplasie linfoidi, nelle slide la tabella è "Summary of Chromosomal translocations, associated lymphoid neoplasms and the affected genes".*) In varie neoplasie le anomalie citogenetiche portano ad anomalie prevalentemente nel controllo del ciclo cellulare, o dell'apoptosi, e quindi si crea un vantaggio di proliferazione. Alcuni esempi di linfomi in cui diventa diagnostica la dimostrazione della traslocazione sono:

- il linfoma mantellare t(11;14), appena visto;
- il linfoma follicolare t(14;18): il 14 è sempre il gene delle immunoglobuline, sul cromosoma 18 si trova il gene per bcl-2, che è un regolatore dell'apoptosi;
- il linfoma a grandi cellule anaplastico t(2;5): tramite una traslocazione, l'oncogene alk (anaplastic lymphoma kinase) insieme a NPM (nucleophosmin) genera una proteina ibrida, la quale può essere riconosciuta con l'immunoistochimica come antigene, oppure si dimostra la traslocazione con la citogenetica classica o di interfase mediante la fish, che è molto più semplice perché si può utilizzare il materiale d'archivio;
- linfoma di Burkitt t(8;14): vi è la traslocazione di c-myc, che è un oncogene molto importante per la proliferazione e la regolazione dell'apoptosi.

(il prof dice che di queste 4 traslocazioni dobbiamo approfondire la patogenesi molecolare e che ai fini dell'esame siamo tenuti a ricordare i numeri dei cromosomi, NdR)

Immunoenzimatica/immunoistochimica L'attività principale dell'anatomo patologo è di tipo morfologico, inoltre circa la metà dei casi vengono approfonditi con metodica immunoistologica per un totale di circa 50-60.000 test/anno. (*per spiegare l'importanza della metodologia mostra l'immagine di un follicolo linfatico simile a questa che ho trovato su Internet, NdR*) All'interno del follicolo si vedono una zona marrone e una celeste: quella celeste è l'insieme delle cellule negative per la proteina antigene che noi andiamo ad indagare con la sonda anticorpale CD3. CD3 è una molecola di superficie molto rilevante nella differenziazione dei linfociti T; tutto ciò che è marrone sono i linfociti T. Quindi vediamo che la struttura fondamentale della risposta immune secondaria, che è il follicolo linfatico, immerso in un ambiente ricco di linfociti T, è costituito da una struttura complessa formata da un mantello costituito da linfociti di piccola taglia, negativi per CD3 perché sono B, e un nucleo centrale, costituito da cellule morfologicamente diverse, più grandi e più irregolari, che sono le cellule del centro germinativo. All'interno del centro germinativo avvengono dei processi che sono alla base dello sviluppo dell'immunità secondaria, della maturazione dell'attività degli anticorpi. Quindi la capacità degli omeotermi di vivere in un ambiente complesso ricco di microorganismi è insorta solamente dopo che il follicolo è stato "inventato" dalla natura nella filogenesi. Il follicolo è anche l'origine di molti tipi di linfoma.

Cosa ci dicono queste metodiche? La clonalità si può dimostrare in diversi modi:

- con le catene leggere;
- con metodiche di biologia molecolare (estraendo il DNA tramite Southern blot, PCR, ecc), che sfruttano i meccanismi di rearrangement per andare a trovare popolazioni clonali.

Le traslocazioni sono dimostrabili essenzialmente con metodiche fish. La biologia molecolare invece è più utile per individuare mutazioni, per esempio inattivanti tumor suppressor genes come p53 o p16, e la mutazione di particolari geni, recettori tirosin chinasi o altri tipi di oncogeni.

Sia con la biologia molecolare che con l'immunoistologia si può dimostrare la presenza di antigeni virali, analisi che si può fare su un tessuto anche dopo la sua immissione in paraffina.

Classificazione WHO E' una classificazione (la più recente è del 2008) che identifica da un punto di vista morfologico, patologico, genetico, immunofenotipico e clinico, tutte le entità nosografiche comprese nel termine di "Emolymphopoeitic neoplasms", quindi tutte le neoplasie collegate alla ematopoiesi e alla linfopoiesi, cioè tutte le patologie mieloproliferative, mielodisplastiche, leucemie acute e i linfomi. I linfomi vengono classificati in diversi gruppi che sono:

- le neoplasie linfoidi a precursori B o T;
- le neoplasie a cellule mature di tipo T, NK o B;
- il linfoma di Hodgkin, anche se è un linfoma B, viene classificato separatamente dagli altri linfomi B per alcune sue particolarità;
- forme più o meno rare che corrispondono all'espansione clonale di cellule con le caratteristiche di cellule dendritiche o macrofagi.

Tenendo conto che quelle immature delle specifiche vanno sotto le leucemie monocitiche, i monociti poi diventano istiociti (*frase non chiara, NdR*).

Sono state pubblicate varie classificazioni negli anni, di volta in volta soppiantate da quelle più recenti. Dal 2000 in poi le classificazioni si sono abbastanza stabilizzate. Le più vecchie erano basate per lo più su criteri morfologici (cellule grandi, piccole, ecc), mentre ora vengono integrate tutta una serie di informazioni acquisite dall'immunologia, dalla fisiologia, dallo studio della differenziazione con marcatori immunologici, dallo studio della produzione di citochine.

(consiglia di ripassare bene l'emopoiesi, NdR)

Ogni linea cellulare ha una sua sequenza maturativa e funzionale. Per esempio i monociti nascono nel midollo, dove le cellule originano da stem cells, che si differenziano in monoblasti e poi promonociti, questi passano come monociti nel sangue dove possono continuare a proliferare. Nel momento in cui passano ai tessuti differenziano in modo diverso a seconda del tipo di tessuto, per cui il monocita che entra nel fegato acquisisce specializzazioni funzionali e morfologiche diventando una cellula di Kupffer; nel momento in cui entrano di nuovo nel midollo possono andare a localizzarsi sulle trabecole ossee acquisendo varie capacità litiche, sintetizzando particolari enzimi (cathepsine, proteasi, ecc) e diventando degli osteoclasti che si attaccano all'osso e fanno funzionalmente parte del rimodellamento dell'osso. Quelli che, invece, entreranno nella milza diventeranno istiociti della milza, nel polmone macrofagi alveolari, ecc.

Quindi le cellule staminali si differenziano in cellule mieloidi e linfoidi. Le mieloidi si differenzieranno in eosinofili, neutrofilo, macrofagi, megacariociti, ecc. I precursori delle T e B hanno passaggi differenziativi particolari, la loro eterogeneità è molto complessa ed è da ripassare perché sta alla base delle caratteristiche dei linfomi.

L'emopoiesi si sviluppa a livello ontogenico in diverse fasi:

- Prima della nascita nel sacco vitellino, nel fegato, nella milza e infine nel midollo osseo; l'emopoiesi splenica ed epatica può essere riattivata nella vita in particolari condizioni (si parla di emopoiesi extramidollare) che possono essere dovute a malattie mieloproliferative;

- Dopo la nascita l'emopoiesi si sviluppa solo nel midollo osseo, in particolari localizzazioni che variano nel corso della vita (tibia e ossa lunghe, poi sterno, vertebre).

L'ematologo andrà a effettuare il prelievo di sangue midollare dalle ossa piatte del bacino, localizzazione meno pericolosa e più riproducibile.

Linfociti I precursori dei linfociti B si sviluppano e maturano nel midollo osseo e poi passano nel sangue, raggiungono le sedi periferiche del sistema linfatico, che sono essenzialmente i linfonodi e la milza. I precursori dei linfociti T si differenziano nel midollo ma per diventare linfociti T maturi devono trasportarsi al timo. Se nel timo lo sviluppo dell'immunità è anomalo possono insorgere malattie autoimmuni, poiché è deputato anche al controllo dell'autoaggressione dell'immunità cellulomediata; pertanto è organo bersaglio di importanti malattie ematologiche, in particolare:

- il linfoma di Hodgkin, soprattutto lo scleronodulare, che si localizza nel mediastino anterosuperiore a livello del timo;
- il linfoma T-cell precursor o linfoblastico (tipicamente un linfoma dell'infanzia).

Linfonodi Sono le stazioni in cui il sistema linfatico ridistribuisce gran parte dei linfociti, e sono le stazioni di controllo e di accumulo degli antigeni. Nei linfonodi abbiamo l'intersezione tra il sistema linfatico e il sistema ematico, che vengono messi in comunicazione per permettere il passaggio dei linfociti da un sistema all'altro, quindi sono molto importanti per il monitoraggio delle infezioni. Il ruolo principale del sistema immune è la difesa dalle infezioni, il ruolo contro i tumori esiste ma è meno importante dal punto di vista Darwiniano della selezione della specie.

Le stazioni linfonodali comprendono diversi distretti con tutte le comunicazioni e disposizioni che si conoscono. La distribuzione, collocazione e numerazione dei linfonodi è molto importante in oncologia, perché è sede di valutazione prognostica e stadiale di tutti i tumori. Quindi un importante dato per classificare i tumori è la verifica dei linfonodi colpiti, dato che viene utilizzato per fare la stadiazione TMN, dove N sta per "Nodes", utile per valutare la prognosi e la possibilità di operare.

L'analisi dei linfonodi può essere fatta patologicamente, ovvero si toglie il linfonodo e lo si analizza al microscopio per vedere se c'è la metastasi. Questo è importante in oncologia per esempio per il colon e per il polmone; per quanto riguarda invece il sistema linfatico, il numero e la localizzazione dei linfonodi impegnati viene utilizzato per la stadiazione delle malattie ematologiche e linfoproliferative. In particolare, nell'Hodgkin viene fatta una stadiazione numerica (1-4) che comprende non solo i linfonodi ma anche la milza e la colonizzazione del midollo osseo.

Quindi dal timo escono linfociti T maturi, che hanno perso i marcatori di immaturità, se questi marcatori vengono conservati vi può essere un importante sospetto di linfoma linfoblastico.

Midollo osseo *(il prof mostra un vetrino simile a questo che ho trovato su Internet, NdR)*

Il midollo è poco vascolarizzato per quanto riguarda il sangue arterioso, ma è permeato da seni venosi. Nel vetrino si riconoscono le strutture vascolari, gli adipociti che sono le zone bianche, il tessuto emopoietico che sono le zone più scure. La valutazione delle proporzioni tra bianco e scuro è alla base della valutazione della cellularità del midollo, della sua rappresentatività diagnostica e della valutazione della funzionalità midollare.

Per esempio nell'aplasia midollare il midollo è totalmente vuoto, in una malattia mieloproliferativa o in una mielodisplasia possiamo trovare un midollo molto più cellulare che nella norma. Il rapporto normale tra la componente adiposa ed emopoietica varia con l'età: un bambino ha circa l'80% di cellularità con scarsa componente adipositaria, mentre in età più avanzata si invertono i rapporti, per cui il rapporto diventa 60:40, poi 70:30, con un lento declino della capacità produttiva del midollo. Tale declino segue la senescenza che caratterizza tutti gli organi. Si parla di immunosenescenza per definire una variazione della capacità della risposta immune, la quale può essere seguita con la variazione, l'aumento, dei linfociti CD8 esauriti (?). Un altro esempio di senescenza è appunto la riduzione progressiva della cellularità del midollo.

Sono visibili in rosa nel vetrino le trabecole ossee (si usa il termine "cancellous") che contengono il midollo. Le trabecole sono sottoposte ad un continuo rimodellamento che è mediato dall'azione trofica degli osteoblasti e da quella distruttiva degli osteoclasti. Tali cellule, seguendo degli equilibri legati alle disponibilità di calcio e di ormoni, per esempio gli steroidi che tendono ad attivare la distruzione ossea provocando osteoporosi, regolano la rigenerazione della componente ossea.

I precursori degli osteoblasti sono delle cellule staminali mesenchimali, precursori comuni delle CD34 stem cell emopoietiche, che sono quelle che si usano nel trapianto di midollo.

L'analisi del midollo si esegue usando particolari aghi che vanno a prelevare del midollo.

L'aplasia e la malattia mieloproliferativa con mielofibrosi possono dare, all'analisi citologica del midollo fatta dall'ematologo, lo stesso risultato, cioè punctio sicca, in quel caso la biopsia differenzia estremi totalmente diversi che alla citologia danno lo stesso risultato.

Negli ultimi 30 anni le biopsie ossee sono state sempre più utilizzate, introducendo tecniche immunoistologiche che rendono molto più informative queste analisi, con l'introduzione di vari tipi di marcatori (per i linfociti T, B, megacariociti, eritrociti, cellule mieloidi, precursori, macrofagi, ecc). Per esempio, il CD138 è un noto marcatore per le plasmacellule, per cui possiamo rapidamente identificare qual è la componente plasmacellulare, quantificarla, e nel momento in cui supera un certo livello di presenza e diventa sospetta, possiamo fare l'analisi delle catene leggere contribuendo alla diagnosi del mieloma.

La diagnosi di mieloma si basa su criteri maggiori e minori come la presenza di componente monoclonale nel siero, lisi ossee e altri fattori, tra cui l'evidenza di un plasmocitoma, cioè un accumulo di plasmacellule che infiltra il midollo osseo sostituendolo, formando delle grosse masse. Se trovate ciò è già conferma di mieloma, anche se gli altri criteri non raggiungono la somma di score (?) per dare la diagnosi di certezza. Il mieloma è una delle patologie più importanti dell'oncologia ematologica. La diagnosi di mieloma ha una serie di problematiche, soprattutto nei casi borderline, nell'evoluzione, nella valutazione della terapia, quindi è diventata importante anche l'analisi della biopsia osteomidollare.

Nel midollo si possono trovare neoplasie ematologiche ma anche cellule di neoplasie non ematologiche. Nel momento in cui nello striscio di sangue l'ematologo riscontri cellule neoplastiche, per esempio di carcinoma della mammella, la sua specializzazione non è più idonea, non capisce che cellule vede e quindi le passa al patologo, il quale può identificare la presenza di cellule epiteliali che non hanno marcatori legati all'emopoiesi ma legati alla natura epiteliale e può quindi concludere una diagnosi di certezza.

Anche sull'istologico, seppure con dettaglio molto minore che sullo striscio di midollo, noi possiamo fare una specie di mielogramma, e quindi valutare la presenza e la distribuzione delle varie tappe maturative delle cellule mieloidi, eritroidi, megacariociti, non semplicemente contandoli ma anche valutandone la collocazione spaziale (*il professore mostra un vetrino in cui si vedono 7 megacariociti normorappresentati e normodistribuiti, NdR*). Nel momento in cui abbiamo una malattia mieloproliferativa come la trombocitemia essenziale in cui c'è un aumento di piastrine, c'è anche un aumento di megacariociti, che noi valuteremo quantitativamente nel midollo e di cui potremmo anche valutare la tendenza a formare cluster (gruppi), caratteristica abbastanza tipica della mielofibrosi idiopatica. Quindi la distribuzione viene persa nello striscio e quindi l'istologia ci dà una dimensione in più rispetto alla citologia, perdendo il dettaglio morfologico ma aumentando il dettaglio sulla distribuzione.

Viene analizzato anche il "disordine topografico". Normalmente la componente mieloide immatura si distribuisce lungo le trabecole e matura verso il centro delle lacune midollari. Quindi il fatto trovare molti precursori mieloidi non nelle trabecole ma spezzati all'interno della lacuna ossea è un'anomalia o disordine topografico. Il disordine topografico di per sé non è patognomonico di nulla, ma insieme ad una serie di osservazioni, per esempio aumento dei vasi capillari all'interno del midollo e distribuzione dei megacariociti, ci dà un pattern correlabile con una particolare diagnosi, che può essere mielodisplasia o mieloproliferativa, tipo mielofibrosi, policitemia vera, trombocitemia essenziale.

La maturazione della componente mieloide si valuta osservando il rapporto di elementi mieloidi immaturi (con nucleo ampio e vescicoloso, nucleolo) che sono metamielociti, pro mielociti e molto più raramente mieloblasti, rispetto alla componente matura che sono i neutrofili segmentati.

Il mielogramma viene fatto sullo striscio di sangue, nel baffo (??) si riconosce un eosinofilo, un megacariocita, nei neutrofili (*si riferisce a una slide, NdR*).

Timo E' un altro organo che nella senescenza tende a diminuire di volume e di peso, mentre aumenta la componente adiposa a scapito di quella parenchimatosa; tuttavia non scompare mai del tutto e funziona per tutta la vita. Il timo del bambino è grande. (*il prof consiglia di ripassare bene l'anatomia, NdR*). La sua struttura può essere suddivisa in tre zone (*viene mostrato un vetrino di timo colorato con TdT, NdR*):

- una zona corticale scura ricca di cellule con il nucleo denso che sono timociti immaturi e linfoblasti;
- una zona midollare chiara con poche cellule meno dense, cioè con la cromatina meno addensata;
- una zona sottocapsulare che si distribuisce a livello della capsula che circonda i lobuli del timo.

La distribuzione istologica e morfologica differenzia 3 zone in cui si hanno fasi diverse della maturazione dei linfociti T. Nella sottocapsulare si ha la fase più precoce, in essa si localizzano i protimociti che sono pochi e sono caratterizzati dall'espressione di alcuni marcatori, come il master gene TdT (Terminal deossinucleotidil Transferasi). Il TdT è un enzima nucleare che aggiunge nucleotidi senza bisogno dello stampo della doppia catena di DNA, e serve per aumentare la variabilità e l'eterogeneità del T cell receptor. È un enzima dimostrabile nel timo che spesso è solamente nei timociti immaturi e nei precursori B nel midollo, quindi è un marker di immaturità fortemente espresso nel timo normale, in minor misura nel midollo, ed è inoltre espresso in tutte le neoplasie linfoblastiche sia B che T. A livello del protimocita vengono espresse molecole di superficie come il CD7, che è uno dei più precoci, insieme al CD2 dei marker T, ma anche già il CD3. Però il CD3 può essere espresso non solo in membrana ma anche nel citoplasma. Il CD3 diventa di membrana solamente quando il protimocita è diventato timocita e quindi è maturato il linfocita T, il che avviene nella midollare. Quindi nella midollare troviamo linfociti con fenotipi maturi, i quali non hanno più TdT e CD3 citoplasmatico ma hanno TdT di membrana e CD4, CD8, CD5, CD2, ecc.

Le zone del timo sono tutte occupate da popolazioni T diverse dal punto di vista maturativo. Il timo è come una spugna in cui crescono i timociti, è costituita da epitelio endodermico con caratteristiche di epitelio squamoso. È un epitelio che differenzia non con lo strato basale come nell'epidermide nell'esofago, ma maturando come delle sacche in cui la parte più matura, come se fosse la parte che produce cheratina nella cute, invece che all'esterno viene maturata all'interno e la fase di maturazione sono i corpuscoli di Hassall (*frase non molto chiara, riporto le parole del prof; NdR*). L'epitelio del timo assiste alla differenziazione dei timociti, ed è importante perché può dare delle neoplasie che vanno sotto il nome di timomi, i quali possono essere di diversa aggressività: se sono compresi nella capsula sono a bassa aggressività, possono uscire dalla capsula e diventare maligni, fino al carcinoma timico che è una neoplasia molto aggressiva. Quindi tra le neoplasie del timo, oltre all'Hodgkin, ai linfomi linfoblastici, al linfoma B mediastinico, sono compresi anche i timomi, da tenere in considerazione per la diagnosi differenziale di una massa mediastinica (solitamente il timoma non compare prima dei 30 anni).

Nella maturazione all'interno del timo i precursori cellulari (common precursor T cells) sono negativi per le molecole di differenziazione CD4 CD8, le quali sono molto rilevanti per la funzionalità ed eterogeneità dei linfociti T. Quindi nella corticale

coesprimono tutte e due le molecole, come nei linfomi linfoblastici. Quando maturano e si muovono nella midollare diventano o CD4+ o CD8+, questa scelta individua la forchetta helper/citotossici che è una forchetta che usiamo anche per la diagnosi differenziale dei linfomi a cellule mature T, che possono essere Null, cioè CD4-/CD8-, CD4+/CD8+ (è raro), oppure CD4+/CD8- o CD4-/CD8+; i CD4-/CD8+ sono numerosi e spesso hanno anche l'espressione di marker di cellule citotossiche o natural killer.

Milza La splenomegalia e la dry tap (punctio sicca) midollare, dovuta a fibrosi midollare, possono essere segni di mielofibrosi o di Hairy cell Leukemia, anche se sono due condizioni totalmente diverse. La milza è costituita da seni splenici, polpa bianca, polpa rossa. È implicata in diverse funzioni:

- la clearance dei globuli rossi danneggiati o da eliminare, mediante un'attività fagocitica da parte dei macrofagi;
- la regolazione del volume sanguigno;
- la risposta immune.

Lo splenectomizzato avrà un deficit immunitario, anche se non particolarmente severo.

Linfonodi I vasi linfatici si distribuiscono sotto la capsula a livello periferico, addentrando con dei seni. I seni possono essere ricchi di macrofagi, deputati alla fagocitosi di corpuscoli voluminosi, detriti cellulari, detriti di microrganismi, ecc. All'interno del linfonodo vi sono delle comunicazioni indirette tra il sistema ematico e linfatico. Il vaso linfatico, l'arteriola e la venula si uniscono a livello della corticale, poi si addentrano nella midollare, dove le vene cambiano la loro struttura: perdono la parete muscolare e l'endotelio diventa ovoidale; vengono definite High Endothelial Venules e sono deputate alla tras migrazione dei linfociti dal sistema venulare al parenchima del linfonodo. È un movimento continuo di cui necessita il sistema linfatico perché i linfociti vanno alla ricerca degli antigeni a cui sono sensibili all'interno del linfonodo. Trovano l'antigene proprio nel linfonodo perché vi è un sistema di filtraggio: il macrofago distrugge gli antigeni complessi, le proteine grosse, rende più piccole le particelle; la presenza di anticorpi forma immunocomplessi che si intrappolano in strutture dette cellule follicolari dendritiche, che sono delle cellule mesenchimali differenziate con una ricca espressione di recettori per fattori del complemento e fattori Fc delle immunoglobuline. Le cellule follicolari, con questi recettori, intrappolano gli immunocomplessi dal siero che continuamente permea il linfonodo. Questo accumulo di immunocomplessi sulle cellule follicolari dendritiche fa sì che i linfociti che le attraversano abbiano una probabilità maggiore di incontro con gli immunocomplessi.

Le cellule follicolari dendritiche si localizzano nel follicolo, mentre i linfociti T occupano prevalentemente la zona paracorticale o interfollicolare. Gli antigeni si accumulano non solo nei follicoli, ma anche nella paracorticale sulle cellule dendritiche interdigitate, le quali non sono di origine mesenchimale perivascolare come le follicolari dendritiche ma sono di origine midollare, come i macrofagi. Entrambe possono diventare neoplasie: mesenchimali, o macrofagiche-istiocitarie quelle dendritiche, producendo istiocitosi.

Nella midollare le cellule B memory, prodotte dalla reazione follicolare, si accumulano come cellule della zona marginale. Esse sono cellule con fenotipo particolare che diventeranno rapidamente plasmacellule, quindi hanno un passaggio differenziativo post follicolare.

La differenziazione dei linfociti T avviene essenzialmente nel timo. La fase immatura della componente B è molto più semplice della T, avviene tutta nel midollo, in pochi passaggi: pro-B, pre-B, linfoblasto B, cellula B matura che esce come linfocita già fornito di recettori. I recettori per antigeni dei linfociti B sono le IgM e le IgD di membrana. Vi è un passaggio differenziativo intermedio tra cellula B immatura e matura che è dato dalla presenza o meno delle IgD, fase che non si riesce a seguire nell'istologia perché a livello midollare i precursori B sono molto pochi, non sono numerosi come nel timo. Questo è dovuto anche al fatto che il midollo è molto più grande, quindi i precursori sono molto più dispersi rispetto alla distribuzione dei precursori T nel timo.

Le fasi possono essere seguite: CD34 stem cell, CD19, CD20 pro-B, CD22 citoplasmatico, CD22 di membrana, pre-B che contiene anche delle catene mu citoplasmatiche, B maturo entra in circolo e la sua ulteriore maturazione è dipendente dall'incontro con l'antigene nel microambiente follicolare.

La reazione follicolare divide i linfomi in prefollicolari e postfollicolari. Le due categorie sono importanti dal punto di vista clinico perché, per esempio, la leucemia linfatica cronica si divide in:

- prefollicolare, molto più aggressiva;
- postfollicolare, più facilmente gestibile dall'ematologo.

Le cellule B attivate nel centro germinativo hanno la maturazione di affinità dei geni che codificano per le catene leggere e pesanti delle immunoglobuline quindi rimettono in discussione il genoma ed è una fase molto delicata per l'oncogenesi perché possono avvenire facilmente traslocazioni (?). Dopo l'ultimo incontro con l'antigene e con il T helper possono diventare plasmacellule, le quali non proliferano molto, ma hanno una fase secretiva che può essere seguita dalla presenza di Ig citoplasmatiche, dalla sintesi di RNA messaggero in grande quantità e quindi la basofilia citoplasmatica, dallo sviluppo di un apparato di Golgi riconoscibile in una macula citoplasmatica, dalla presenza di Ig policlonali in una popolazione normale.

Lezione di Anatomia Patologica del 31/10/2013 (1)

Lezione di anatomia patologica del Professor Chilosi del 31/10/2013

Sbobinatore: Parolini Sara
Revisore: Lucrezia Caoduro

Non vedremo a lezione tutto nel dettaglio, ad esempio non guarderemo le leucemie mieloproliferative che potrete trovare sui libri. Oggi vi dò solo un quadro generale e degli esempi, per poi applicarli anche agli argomenti che non vediamo a lezione.

La differenziazione linfocitaria è differente da tutte le altre rispetto alla maturazione e differenziazione. Di solito le stem cells epiteliali sono: prima a bassa proliferazione, poi diventano proliferanti, poi differenziano, l'epitelio diventa funzionalmente maturo.

Nei linfociti invece abbiamo successive e molteplici fasi di proliferazione, maturazione differenziazione che portano al prodotto finale: la plasmacellula, per quanto riguarda il comparto dei B. Differenziate tra loro per il tipo di Ig che loro producono.

Per arrivare alla plasmacellula, abbiamo una differenziazione che inizia nel midollo osseo, una fase proliferativa blastica iniziale poi un livello di maturazione che porta a un piccolo linfocita resting che gira, arriva al linfonodo, ha un'altra fase di maturazione blastica nel centro germinativo... Quest'immagine si riferisce a cellule in fase S nel linfonodo, quindi concentrate nel centro germinativo, ma non solo. Anche queste sono cell germinative (indicate sulla slide con una freccia) anche questo che è un seno, cioè un tubo in cui circolano gli elementi linfoidi. Anche questo contiene le cellule in proliferazione.

Il successivo passaggio è quello a cell memory (o cellula della zona marginale) che quindi potrà diventare una plasmacellula. Quindi fasi diverse per arrivare ad un prodotto finale che è la plasmacellula.

Le plasmacellule si dividono in secernenti IgA, IgM... e tutte le altre catene pesanti. A seconda del tipo di catena pesante hanno funzione diversa e localizzazione diversa. Infatti le IgA sono sulle mucose, le IgG nel midollo, dove ritornano. Oppure anche nei tessuti periferici, linfoidi e in generale in tutto l'organismo.

Le plasmacellule hanno una morfologia, un fenotipo. Queste caratteristiche le ritroviamo nella neoplasia delle plasmacellule che è il mieloma plasmacellulare.

Mieloma-mielo- viene da midollo, quindi una neoplasia midollare, fatta da plasmacellule mature macroblastiche. Attenzione! Esistono dei plasmocitomi non midollari, quindi non mieloma plasmacellulare, che hanno una caratteristica clinica molto diversa. Spesso sono la base più matura di un processo linfoproliferativo con le caratteristiche del linfoma B della zona marginale (spesso noti come MALT linfomi). Un linfoma MALT, cioè associato alle mucose, può talvolta avere una differenziazione in senso plasmacellulare, quindi presentarsi con cellule a diversi stadi maturativi fino alla plasmacellula matura. Talvolta questa componente plasmacellulare può essere prevalente e presentarsi quindi come plasmocitoma (ad esempio del polmone). Non è mieloma, è un plasmocitoma! È più simile a un linfoma della zona marginale che a un mieloma. Dal punto di vista clinico cosa significa tutto ciò? Che il mieloma è una malattia molto eterogenea e seria con prognosi infausta, molto invalidante; il linfoma MALT è quello che matura in plasmacellule, è un linfoma a basso grado che si controlla abbastanza facilmente e ha una prognosi e approccio terapeutico molto diverso dal plasmocitoma.

Perché dico questo? Per sottolineare come la conoscenza non solo morfologica, ma anche dei contesti, delle sedi, in cui la malattia si sviluppa, in campo ematologico definisce delle entità differenti. E' molto importante che queste eterogenicità vengano trattate in modo dettagliato. La diagnosi precisa e completa in ematologia è un concetto diverso da altri campi dell'oncologia, in cui sicuramente servono dettagli e precisione ma non a livello critico come in emato-oncologia.

Probabilmente la comprensione dello sviluppo e del significato delle lesioni delle strutture del sistema linfatico è la guida per capire i linfomi.

Il follicolo linfatico con centro germinativo, a livello filogenetico, nasce negli omeotermi (cioè negli animali a sangue). Perché? Perché il follicolo è la sede in cui la produzione di anticorpi passa da una fase un po' rozza, ad una più raffinata. Gli animali a sangue freddo (pesci, anfibi, rettili) hanno un sistema linfatico ma non dei follicoli linfatici. Hanno le cellule B, che producono anticorpi ma non hanno i follicoli, quindi non riescono a sviluppare Ig di classe IgG differenziate e con aumento di affinità per gli Ag. Questo rende il loro SI meno efficiente di quello degli animali a sangue caldo. Questi ultimi infatti, avendo fatto la scelta di far vivere le loro cellule sempre a 37°C, le mettono in competizione con i microrganismi (anch'essi amanti dei 37°C). Quindi, per potersi difendere, hanno dovuto sviluppare un sistema immune più efficiente. Sembra una banalità, ma se mettiamo il latte a 4° o a 37°, il tempo di aggressione da parte dei microrganismi è molto diverso!

Perciò il sistema immunitario a 37° deve sviluppare tutta una serie di meccanismi per poter essere efficiente: quindi switching di classe e la maturazione somatica, che appunto avvengono nel centro germinativo. Con un meccanismo di proliferazione e selezione apoptotica delle cellule che proliferano nel centro, i cloni B hanno delle mutazioni somatiche a livello delle Ig, variano il recettore per gli Ag. Questa variazione può essere positiva perché crea un anticorpo più efficiente, con maggiore affinità o qualche volta con minor affinità [...non si capisce].

Ho fatto l'altra volta l'esempio delle discoteche come luogo d'incontro. L'incontro tra i cloni B e l'antigene avviene a livello di raccolta di immunocomplessi nel centro germinativo. Le cellule follicolari dendritiche che vediamo nella slide, sono dotate di recettori che legano gli immunocomplessi (segnati in giallo sulla slide, sono i depositi di immunocomplessi). In questa zona (centro germinativo ndr) quindi gli Ag e i cloni B vengono messi a contatto. I cloni che possono produrre Ig ad alta affinità sopravvivono, quelle che non hanno questa capacità inesorabilmente e rapidamente nella maggior parte dei cloni, vanno in apoptosi e vengono eliminati.

La regolazione di questo meccanismo è data da geni che regolano proliferazione e apoptosi, in particolare Myc e Bcl2 e altri meccanismi molecolari.

La conoscenza di questi meccanismi è la base della diagnostica e della comprensione dei linfomi.

Gli stessi marcatori li andiamo a cercare per caratterizzare i linfomi. Quindi linfociti che arrivano al linfonodo, maturano, si sviluppano nel centro germinativo. La fase mantellare è una fase di stazionamento, sono pre centro-follicolare quindi sono naive. Dopo essere uscite dal centro germinativo diventano cellule di memoria, pronte a diventare plasmacellule dotate di una cortina particolarmente azzollata, un citoplasma ricco di RNA (quindi basofilo). Perciò la morfologia rispecchia quello che avviene a livello fisiologico cellulare.

Questa immagine è uno schema molto informativo, vediamo il centro germinativo, vediamo una sintesi della differenziazione della cellula B e i linfomi che si sviluppano a livello dei vari compartimenti. Quindi è una corrispondenza tra fisiologia e patologia oncologica. La comprensione di questa diapositiva è la chiave di entrata nella classificazione e nella comprensione della patogenicità. Chi impara bene questa diapositiva avrà tutto chiaro a livello di classificazione, nelle vie generali. E mi spiego:

normalmente abbiamo cellule B naive che sono quelle che escono dal midollo. Hanno IgM e IgD di membrana non producono Ig di citoplasma, hanno IgM e IgD come recettori possono produrre solo quelle, sono naive poco efficienti.

Entrano nel centro germinativo dopo aver incontrato il loro Ag, che si lega al recettore, lo trasportano a livello della Antigen Presenting Zone nella zona paracorticale del linfonodo, cioè nella zona T. Qua ricevono il primo segnale che li fa entrare nel motore del centro germinativo. Lì cominciano a proliferare, il clone si espande e alterazioni del gene delle Ig aumenteranno o diminuiranno la loro affinità per l'Ag. Cementano il loro anticorpo con l'Ag presente sulle cellule follicolari dendritiche. Se hanno un incontro proficuo, cioè se il loro anticorpo viene ritenuto buono, passano alla zona chiara (quindi diventano centrociti) e poi escono dal centro del follicolo. Diventano così cellule di memoria che produrranno poi plasmacellule. Le cellule di memoria sono nella zona marginale (ai margini del follicolo). Quindi il follicolo ha in realtà 3 zone:

- Mantello → cell naive.
- Centro germinativo → cellule in proliferazione.
- La zona marginale → zona dove si accumulano in transito le cellule di memoria.

La zona marginale ha cellule che migrano in tutti i distretti, in particolare nelle mucose. Per questo il linfoma delle mucose è essenzialmente un Marginal Zone Linfoma. Cioè ha le caratteristiche/il fenotipo delle cellule B della zona marginale. La B rincontrando di nuovo l'Ag diventa plasmacellula nelle mucose, ma anche nel midollo e in generale nelle sedi primarie.

Qui con le frecce sono descritti i linfomi corrispondenti:

A livello prefollicolare -quindi cellula naive- avremo → il **Linfoma a cellule del mantello**. Esso è un linfoma molto aggressivo dal punto di vista clinico. Parte da cellule piccole, non prolifera tanto, ma è un linfoma che uccide i pz inesorabilmente in pochi anni. Più recentemente sono state introdotte delle terapie che riescono con molta difficoltà e con protocolli molto complessi a migliorare la prognosi e la sopravvivenza di questi pazienti. Quindi a livello della cellula naive (cioè del Mantello) abbiamo un Mantel-zone-Lymphoma.

A livello del centro germinativo abbiamo diverse fasi caratterizzate da proliferazione, maturazione, Bcl2 come selettore di sopravvivenza. Nel centro germinativo abbiamo diversi tipi di linfoma. E' un momento pericoloso biologicamente, si ha una messa in discussione di nuovo del genoma, quindi si possono sviluppare frequentemente delle neoplasie linfatiche. Esse che vanno sotto il nome di **Linfoma Follicolare**, **Linfoma Follicolare Diffuso**, **Linfoma di Burkitt** e i **Linfomi Diffusi a grandi cellule B**, diffusi e molto aggressivi. Il Linfoma Follicolare e quello Diffuso a grandi cellule B sono quelli più comuni. Perciò vanno saputi molto bene e ricordati. Il Burkitt è molto particolare, può essere endemico o sporadico ed è legato ad anomalie della regolazione dell'apoptosi per anomalie del gene Myc.

Il centro germinativo può essere collegato anche alla genesi di altri linfomi, in particolare alla genesi del **Linfoma di Hodgkin**, un linfoma B caratterizzato solo dopo decenni di studi. Viene separato dagli altri linfomi per alcune sue particolarità che vedremo la prossima volta.

E' molto frequente, è guaribile nell'80% dei casi, va trattato con molta attenzione perché guarire o non guarire dipende da un corretto approccio alla malattia.

Insieme al linfoma di Hodgkin mettiamo il **Linfoma B a grandi cellule del mediastino**, che è molto particolare. A differenza degli altri linfomi diffusi a grandi cellule B, colpisce prevalentemente persone giovani. È molto aggressivo, ma se curato tempestivamente e in modo idoneo è guaribile completamente in molti pz, quasi la totalità. Un'altra caratteristica di questo linfoma è che è stato descritto per la prima volta in poche sedi mondiali. Tra queste Verona, che lo annovera tra i suoi successi in campo ematologico. Il protocollo usato attualmente a livello mondiale per la cura è stato sviluppato dal professor Todeschini. Dalle plasmacellule o corrispondentemente alle plasmacellule, come dicevo prima (vedi descrizione e differenze mieloma plasmocitoma sopra) abbiamo il **Mieloma Multiplo**.

La zona marginale corrisponde invece a → linfomi B delle mucose (quindi MALT).

Da cellule con le caratteristiche di cellula memory abbiamo → Leucemia Linfatica Cronica, Linfoma B della zona marginale della milza e altre sottotipi di linfomi che pur essendo ben individuabili e trattati in modo differente e specifico, costituiscono un insieme di forme più rare rispetto a quelle che vi ho elencato. Quindi Linfoma Follicolare, Linfoma Diffuso a grandi cellule, Mieloma e Leucemia Linfatica Cronica, sono i più diffusi.

La **Leucemia Linfatica Cronica** si suddivide in due sottotipi: uno corrispondente a cellule post follicolari, cioè che hanno avuto una reazione follicolare, quindi evidenziabile con le mutazioni somatiche a livello del recettore B; un altro gruppo con caratteristiche pre-follicolari che non hanno queste alterazioni. Importante ricordare che questi due sottotipi hanno delle prognosi diverse: quelle pre-follicolari sono molto più gravi, meno gestibili dal punto di vista della terapia, non sono indolenti, sono aggressive e assomigliano un po' al linfoma a cellule della zona del mantello. Quindi in sintesi in questa diapositiva abbiamo le forme più frequenti e importanti dei Linfomi B e le controparti normali.

Quindi la differenziazione e la maturazione hanno delle fasi di proliferazione e delle fasi resting successive: la cell B matura sta sempre in G0 quindi non prolifera, così come non proliferava l'iniziale stem cell. In seguito diventa un linfoblasto che prolifera, dopodiché ritorna resting, quindi prolifera nel centro germinativo e poi ridiventa resting. Queste varie fasi le possiamo seguire con l'immunofenotipo che è diventato uno degli strumenti fondamentali per capire l'immunologia da parte degli immunologi e degli immunopatologi. Infatti gli ematologi e gli ematoematologi usano l'immunofenotipo per distinguere e validare le diagnosi. Fondamentale è l'uso di marcatori per la loro differenziazione.

Vedi i grafici:

Abbiamo in rosso verde e giallo tutti i marcatori (o quasi) utilizzati. La forma tumorale corrispondente invece sta al livello di ascisse e ordinate, così come nella battaglia navale. Insomma non è così semplice ma più o meno lo schema è questo.

Il profilo immunofenotipico è l'insieme dei marcatori che caratterizzano un'entità nosografica particolare. Esempio: abbiamo un'entità nosografica: Leucemia Linfatica Cronica, Linfoma Follicolare, Linfoma della zona marginale, MALT diffuso a grandi cellule, Linfoma Multiplo, Hodgkin Classico, Hodgkin nodulare a prevalenza linfocitaria. I gialli sono i marker variabili, quelli meno affidabili. Possono essere positivi o negativi questo dipende dalla sensibilità e dall'esperienza dell'ematopatologo.

L'altra volta abbiamo visto le classificazioni, quella attualmente utilizzata è quella della WHO del 2008.

Quali dovete conoscere? Quelle della diapositiva di prima, dei Linfomi B. Quindi una domanda possibile è: mi parli del Mieloma Multiplo.

Il Linfoma di Hodgkin si divide in due gruppi principali. Uno maggioritario dal punto di vista numerico che è il **Linfoma di Hodgkin Classico**.

-una volta si chiamava Malattia di Hodgkin oggi si chiama linfoma perchè è stato dimostrato essere una neoplasia clonale formata da cellule che sono biologicamente cellule B, anche se è stato difficile dimostrarlo.

-Si suddivide in 4 varianti istologiche:

1. classica;
2. scleronodulare;
3. a prevalenza linfocitaria diffusa. Da non confondere con quello a prevalenza linfocitaria nodulare che è l'altro tipo di linfoma di Hodgkin;
4. a cellularità mista.

Domanda incomprensibile che verteva sul linfoma di Hodgkin il Prof risponde dicendo che affronterà le caratteristiche dell'Hodgkin nel dettaglio la prossima lezione. Accenna che nell'Hodgkin Classico le caratteristiche biologiche come cellule B sono limitate, carenti. Spesso non hanno CD20 rarissimamente CD79 e non hanno Ig di superficie. Caratteristiche che lo rendono particolare.

I Linfomi T

Abbiamo visto l'altra volta come avviene la differenziazione dei T. È bene ricordare però le caratteristiche funzionali perché esse ci portano a capire le immunodeficienze, le malattie autoimmuni, le infezioni... Capire bene il sistema immune significa capire meglio come ci si difende dalle infezioni.

L'eterogeneità dei T corrisponde anche a una eterogeneità estrema dei Linfomi T. Facendo delle corrispondenze morfologiche, fenotipiche, funzionali tra il normale e il patologico si possono costruire classificazioni comprensibili e che siano anche ricordabili.

Le classificazioni attuali sono basate sulle caratteristiche morfologiche patologiche e molecolari che definiscono delle carte di identità di una singola entità nosografica. Quanto più precisamente si sviluppa un tumore con caratteristiche di una delle varie forme, tanto più precisa, facile e veloce è la diagnosi. Quando abbiamo un caso più borderline che si sposta in una o nell'altra, allora la diagnosi è più difficile. L'ematologo quindi riceve l'informazione che la definizione non è precisa ed esatta e quindi dovrà lavorare con maggiore livello di ambiguità. Se noi individuiamo, per esempio, il Linfoma Linfoplasmacitico, vediamo che molto spesso ha le IgM. Quindi è un linfoma che produce le IgM, quindi corrisponde una malattia di Waldenström, che colpisce le catene pesanti delle IgM anche presenti nel siero.

Il linfoma a cellule del mantello avrà potrà avere le IgM e IgD, ma non nella componente secretiva; è caratterizzato dall'espressione del CD5, è negativo per il marker CD23 (che è della LLC) e così via... E' una specie di carta di identità che insieme alla morfologia e alle caratteristiche cliniche definisce esattamente la malattia.

Come affrontiamo quindi l'eterogeneità? La classificazione prevede una suddivisione in due grossi gruppi, sia per i B che per i T, che forme a precursori T a precursori B, a cellule mature T a cellule mature B.

Le leucemie linfoblastiche hanno la fortunata posizione di essere tra le leucemie (gli ematologi le classificano come leucemie acute) ma anche tra i linfomi perché in realtà sono linfomi. Sono quindi presenti in due diverse classificazioni. Nella FAB la classificazione delle leucemie è nei linfomi, nel gruppo corrispondente ai processi linfoproliferativi (o linfomi) a cellule precursori.

La morfologia è quella di una cellula immatura, quindi poco citoplasma e tanto nucleo, cromatina finemente dispersa. Si suddivide in leucemia B o T. Morfologicamente possono essere confuse, ma con l'immunofenotipo si distinguono. La leucemia linfoblastica B ha una prognosi migliore. In generale i linfomi T sono peggiori dei B. Le leucemie linfoblastiche si possono dividere morfologicamente in L1, L2, L3 a seconda del tipo di blasto. A L3 corrisponde una localizzazione midollare leucemica del linfoma di Burkitt. Quindi Burkitt e leucemia linfoblastica B L3 sono equivalenti. Il che vuol dire che un linfoma di Burkitt può colpire un linfonodo, un tessuto extralinfonodale, può prendere il midollo, può diventare leucemico. Questo accade a seconda della presentazione e a seconda di chi li ha descritti e li diagnostica: chi vede il midollo o il sangue periferico diagnostica una Leucemia Linfoblastica B L3, il patologo vede il tessuto diagnostica linfoma di Burkitt, ma sono esattamente la stessa malattia. La classificazione immunologica si basa quindi sulla dimostrazione di marker (→ si veda tabella da leggere dalle slides).

Come organizzare queste informazioni? Quadro generale, maturazione, differenziazione, corrispondenza con le varie entità nosografiche, conoscenza di ogni singola entità (quelle più rilevanti come frequenza o importanza dal punto di vista biologico) con delle semplici schede cliniche-patologiche, come quelle che si vedono sulle slides.

Ad esempio: della Leucemia Linfoblastica cosa sapete?

-neoplasia maligna

-origina da un singolo progenitore B (perché singolo? Perché essendo un clone è una singola cellula un po' sfortunata che ha un'alterazione del genoma, che altera la regolazione della proliferazione e dell'apoptosi e quindi riesce a sopravvivere in modo anormale rispetto a quelle normali). Non è sottoposta alla regolazione del microambiente, alle citochine, ai segnali, per cui continua a proliferare invadendo il tessuto dove è nata per poi espandersi in vari distretti. Ovviamente più è proliferante, più è rapida la crescita della massa tumorale, più velocemente interferirà con la fisiologia dell'organismo a livello sistemico. Questo provoca malattia e morte del pz. Quindi queste che sono molto proliferanti vengono definite leucemie ACUTE. Acute significa che in pochi mesi senza terapia il pz muore. La leucemia CRONICA invece è quella in cui senza terapia ha lo stesso un effetto letale sul pz, ma in tempi più lunghi.

-il progenitore può essere o B o T

Le leucemie colonizzano velocemente il midollo quindi interferiscono con l'ematopoiesi normale sottraendo spazio e risorse alla ematopoiesi fisiologica. Daranno quindi anemia, trombocitopenia, neutropenia con effetto di interferenza funzionale (rispettivamente deficit nel trasporto dell'ossigeno, deficit nella coagulazione, deficit immunitari).

Le leucemie acute linfoblastiche sono distribuite dal punto di vista epidemiologico in base all'età, con picchi nei primi anni di vita. Peraltro le forme B hanno una maggior possibilità di essere curate e guarite. Possono essere acquisite in qualsiasi età, con un aumento leggero verso la tarda età. Esiste un'associazione tra Leucemie Acute sia T che B e Leucemia Mieloide Cronica. Infatti nella Leucemia Mieloide Cronica, quando si ha una crisi blastica, può essere a cellule blastiche B. Com'è possibile che una cella mieloide nella sua evoluzione possa diventare una cellula T? Non è facilmente comprensibile se non si sa la genesi della LMC. Essa si sviluppa da un'alterazione genetica del gene Bcl-Abl precursore, un precursore comune linfoide e mieloide. Quindi molto immaturo, un CD34. Dato che questa anomalia dà un vantaggio (andare meno in apoptosi) rispetto alle altre componenti mieloidi, vince rispetto alle cellule non neoplastiche ma mantenendo la capacità di maturazione, di risposta al microambiente. Quindi il precursore ha un vantaggio dal punto di vista apoptotico/proliferativo ma continua a differenziare: diventa mieloide, si accumula nel sangue periferico e ti dà la malattia. Il clone però conserva la componente staminale alterata e può andare incontro ad una seconda mutazione, un'altra anomalia a livello del genoma. Questa gli dà un altro vantaggio proliferativo, togliendogli la capacità di differenziare. Di conseguenza si amplificherà il clone con le caratteristiche di immaturità che potrà avere la faccia di una cellula blastica mieloide (quindi LLA) o anche una LLA spesso a fenotipo B. Questa è l'interpretazione delle crisi blastiche che si evidenziano nella Leucemia Linfoblastica.

Linfomi a cell B mature.

Sono tanti. Vediamo ora i linfomi che si originano dal centro germinativo, in particolare il: Linfoma Follicolare.

Può facilmente essere chiesto all'esame con dettaglio. (Al prof piace se viene capita e spiegata la patogenesi, e come si diagnostica).

E' caratterizzato nella maggior parte dei casi dalla traslocazione caratteristica chr. 14 - 18 (si vede nel 85% dei pz), che altera l'espressione della proteina Bcl2. Essa è deputata all'inibizione dell'apoptosi. Quindi nel momento in cui il genoma viene scardinato, Bcl2 è iperespresso, quindi l'apoptosi è inibita. Le cellule sopravvivono più a lungo, anche se proliferano meno! Infatti i linfomi follicolari spesso hanno un indice proliferativo minore nel centro germinativo (specialmente nel grado 1 o 2). Infatti il centro germinativo normale prolifera di più di un centro germinativo neoplastico di un Linfoma Follicolare. Questo perché il vantaggio non è dato dalla proliferazione ma dalla mancanza di apoptosi. Se voi volete riempire una vasca, potete aprire di più il rubinetto oppure chiudere di più il tappo. Se avete poca acqua e tanto tappo si riempie. Se avete un tappo un po' aperto ma buttate grandi quantità di acqua, si avrà una perdita maggiore di acqua.

Nel centro germinativo neoplastico è alterato il rapporto tra entrate e uscite: si ha l'accumulo di cellule B follicolari poco proliferanti che intasando il sistema producono un danno.

Il suo profilo immunofenotipico → bisogna sapere che esiste, e le caratteristiche fondamentali.

I marker da ricordare sono CD10, sicuramente non il CD19, il CD20 (anche perché è un farmaco). Il CD5 e il CD23 perché il primo è il marker in negativo del Linfoma Reticolare ma è positivo nella LLC e nel Linfoma a cell del mantello. Nel follicolare è importante in negativo, nelle altre è importante per la diagnosi differenziale. Non c'è nella slide, ma noi potremmo aggiungere il Bcl6.

Il linfoma follicolare non è aggressivo, è asintomatico, non si presenta in modo aggressivo. Spesso è monostazionale. La terapia è molto tranquilla perché questo linfoma è una forma indolente, cioè a basso grado di malignità. Però ha bassissima, se non nulla, possibilità di guarigione. "Quando uno ce l'ha se lo tiene". La terapia serve a mantenere contenuta la malattia che però prima o poi esplosa, accelera la sua aggressività. Tante volte diventa un linfoma a grandi cellule e quindi la prognosi è infausta, anche se in tempi più lunghi rispetto ad altri tipi di linfomi. Porta a morte circa dopo uno due anni dalla trasformazione. Della terapia ve ne parla l'ematologo. È una malattia dell'età adulta e dell'anziano, anche se esistono forme pediatriche. È però diversa la patogenesi, in quella del bambino è rarissima la traslocazione chr.14-18 del Bcl2. L'assenza di questa traslocazione c'è anche in una minoranza di casi nell'adulto.

Un'altra singolarità è che in Europa o nei paesi occidentali è uno dei linfomi più frequenti, mentre in Giappone o nei Paesi orientali è una rarità. Non si sa perché.

Presentazione: linfadenopatia. Spesso ci si accorge trovando ingrossamento del collo o dell'inguine durante l'igiene quotidiana. La linfadenopatia è un segno da non sottovalutare. Il linfonodo ha un significato diverso a seconda della localizzazione. Bisogna però non sovrastimare questi segni generali nell'indirizzo dell'azione da compiere.

Esempio: Pz 30 anni va dall'otorino per un ingrossamento di un linfonodo laterocervicale. L'otorino riscontra infiammazione dell'orecchio, attribuendo ad essa la causa della linfadenopatia. Il medico la ritiene un'infezione, sottovalutando la questione. Il paziente dopo qualche mese scopre di avere un linfoma (un Hodgkin magari) che ormai però si è già diffuso e si è localizzato anche al mediastino. Se si fosse diagnosticato prima, la terapia sarebbe stata meno aggressiva perché lo stadio sarebbe stato più precoce. Sappiamo che la stadiazione dell'Hodgkin aumenta passando da stazione linfatica a stazione linfatica. La stadiazione

ovviamente influenza la prognosi. Questo ci mostra che a volte una maggiore attenzione e indagini più approfondite possono fare la differenza. Il caso che vi descrivo è vero, il pz è morto.

Altro esempio: linfonodo in sede anomala, tra ghiandola mammaria e ascella in una giovane donna è stato interpretato come un nodulo. Può diventare invece una diagnosi di linfoma.

Linfonodo in un giovane escisso, può dare anche solo diagnosi di mononucleosi. Il danno in questo caso è aver tolto un linfonodo per nulla.

Mai fidarsi troppo delle curve statistiche! È vero che ci dicono che la malattia è più frequente nell'anziano e sporadicamente nel bambino, ma può anche non essere così! Le curve statistiche sono molto importanti, però ad esempio: anche se so che il timoma si sviluppa soprattutto in età adulta o nell'anziano, devo essere consapevole che potrei trovarlo anche in un bambino di quattro anni. Sarà molto meno probabile ma non impossibile.

Altro esempio: non devo escludere un carcinoma della mammella solo perché i segni si manifestano nel maschio. È possibile che un carcinoma della mammella colpisca anche i maschi e non va escluso a priori.

Tornando alla presentazione abbiamo detto: linfoadenopatia diffusa e non dolorante.

Diffusa è una semplificazione. La linfoadenopatia può essere singola o diffusa. Tipicamente è diffusa. I sintomi generici tipo febbre, calo di peso sono molto meno frequenti che in altri tipi di linfoma.

Maggiore è l'attenzione che si dà alla diagnosi precoce e maggiori sono le risorse socio-economiche a disposizione, più facile sarà identificare le patologie in fase più precoce. Probabilmente in questo momento in Grecia diagnosticheranno Linfomi Follicolari più in fase wildspread rispetto a quelli con singolo linfonodo. Perché l'attenzione è puntata su patologie più severe e più gravi. Non ci sono risorse per screening.

Morfologia

La slide mostra la morfologia cellulare del linfoma di grado 1. Grado 1 = cellule piccole, centrociti, cellule irregolari, un po' piegate (le vedete come una specie di bocca e occhio, una faccetta). Esse venivano chiamate cellule clivate o cleaved. Infatti nella classificazione di 20 anni fa dei linfomi, la descrizione morfologica per la classificazione parlava di cellule clivate e non clivate. Il linfoma follicolare era: Follicolar cleaved o non cleaved Linfoma.

Il linfoma di grado 3B, quindi quello più aggressivo (con cellule più grandi chiare blastiche non clivate chiamate centroloblasti), veniva chiamato Linfoma Follicolare non cleaved perché prevalevano le forme più grandi. Attualmente queste distinzioni non esistono più. C'è il Linfoma Follicolare, e il grado dipende dal numero di cellule più piccole o più grandi. Seguito dal follicolare che può essere: **Linfoma Follicolare follicolare** oppure **Linfoma Follicolare follicolare diffuso**. Perché può avere una presentazione in cui coesista una componente che ancora mantiene un'organizzazione strutturale del follicolo con parte del linfonodo infiltrato da cellule che hanno perso queste caratteristiche e sono diventate diffuse. Prognosticamente finché queste 2 componenti permangono mantenendo la stessa morfologia di quelle del citologico, la prognosi non varia. Del linfoma follicolare, oltre che individuare il grado, va anche stadato. Come in tutti i linfomi, dalla stadiazione può dipendere la prognosi.

Domanda che non si sente:

Nel follicolare follicolare...nel follicolare diffuso ci sono un po' di pallotte e zone in cui si sono fuse. Nel follicolare, il nodulo contiene anche cellule follicolari dendritiche, contiene linfociti T, mantiene il suo microambiente, quando diventa diffuso la perde, i T non ce ne sono più, ci sono solo CD4 che non hanno quelle caratteristiche... quando poi va avanti nella diffusione dell'organismo può uscire dal linfonodo migrare nella milza. E così abbiamo il coinvolgimento splenico del linfoma follicolare che colonizza la polpa bianca. Essa apparirà ingrandita, iperrappresentata, sempre mantenendo una struttura follicolare concentrata nella polpa bianca.

Nel midollo il Linfoma Follicolare caratteristicamente si localizza in sede parafollicolare. Quella a sinistra, è un'immagine molto caratteristica di cosa significa parafollicolare: si spalma intorno alle trabecole. Quando raggiunge il midollo per via ematica o comunque quando arriva a livello delle trabecole, trova un microambiente giusto per svilupparsi.

Il Linfoma Follicolare viene stadato facendo la biopsia ossea midollare. Viene cercata la presenza di queste cellule B e, se noi troviamo questo tipo di localizzazione, siamo abbastanza tranquilli.

Il profilo immunofenotipico:

Il CD79, CD20 sono marker caratteristici delle cellule B. Il CD23 è negativo. È presente però nelle follicolari dendritiche, si evidenzia quindi si evidenzia la conservazione della struttura network del follicolo (a differenza della cellula normale, nel network del follicolo non si accumulano immunocomplessi). Quindi non funziona più da centro di raccolta e incontro con l'antigene. Il Bcl6 è positivo ed è un importante marker. CD1 va ricordato perché è il marker del Linfoma a cellule del mantello, è legato anche alla patogenesi molecolare. Il CD138 è negativo, questo è il marker delle plasmacellule. Il Bcl2 è caratteristicamente positivo. E qui approfondiamo, perché la patogenesi del linfoma è collegata all'iperespressione del gene Bcl2, ma solo nella sede centro follicolare e in corrispondenza con l'espressione di Bcl6. Il terminaldeoxinucleotidiltransferasi è negativa perché è un linfoma a cellule mature.

Citogenetica:

il tipico marcatore Bcl2 è iperespresso per via della traslocazione 14, 18, q32, q21. Il braccio lungo che stacca tra due cromosomi diversi due geni e li attacca. Così si vengono a creare il Bcl2 attaccato al gene che codifica per le catene Ig. Questo gene diventa così sempre acceso e non risponde più al segnale di spegnimento. Lo spegnimento di Bcl2 avviene nel centro germinativo, a seguito del riconoscimento dell'Ag ad alta affinità da parte dell'immunoglobulina. Il Bcl2 quindi viene acceso nel centro germinativo.

Quindi abbiamo un clone che prolifera, non va in apoptosi, quindi si espande. La traslocazione può essere visualizzata in diversi modi: con citogenetica classica, con la FISH (ibridazione in situ in fluorescenza) o mediante un surrogato che è la ricerca del Bcl2 in situ.

Il Bcl2 sul cromosoma 18 viene attaccato al cromosoma 14 e viene iperespresso. Il Bcl2 nel linfonodo reattivo è negativo, nel linfoma è positivo. Nel mantello è positivo nel reattivo ma anche nel linfoma. Quindi l'interpretazione di questo marcatore va fatta essendo certi che il Bcl2 corrisponda a una popolazione centro-follicolare quindi che abbia il Bcl6. Quindi come si fa? Usiamo la FISH mediante sonde di acidi nucleici e si dimostra abbastanza facilmente. Il Bcl2 è un proto oncogene contenuto nei mitocondri, è legato alla regolazione dell'apoptosi (→ vedi diapo con regolazione dell'apoptosi in cui compare bcl2 che è un punto cardine in tale regolazione).

Lezione di Anatomia Patologica del 7/11/2013 (1)

Professor Chilosi

Sbobbinate: Chiara Miatello

Revisore: Nicolò Bombardelli

[inizio registrazione disturbato, introduce la lezione]

...l'analisi dell'eterogeneità dei processi linfo-proliferativi e in generale con metodi immunofenotipici che, come abbiamo detto l'altra volta, sono fondamentali a livello del [audio disturbato].

Abbiamo visto il linfoma follicolare, le caratteristiche fenotipiche, il fatto che sia indolente ma non guaribile. Brevemente un'altra grossa categoria dei linfomi B diffusi a grandi cellule: linfomi caratterizzati da una proliferazione maggiore ed evidente, che può variare da un 30-40% di percentuali cellule in fase S fino a 100%; i linfomi diffusi a grandi cellule sono molto numerosi e in alcuni casi, pure essendo linfomi aggressivi che portano velocemente a morte i pazienti se non curati, se trattati con una terapia efficace possono essere guariti. Ovviamente le percentuali sono variabili a seconda del loro tipo e la definizione delle caratteristiche patogenetiche di questi linfomi corrisponde in parte con la prognosi e con la possibilità di guarigione.

I linfomi diffusi [mostra una tabella relativa ai linfomi B] sono positivi per i marker B, negativi per i marker T, e hanno una serie di marcatori che ne permettono una sub-classificazione.

[il professore indica una scheda clinica e dice che cercherà una review a proposito]

Per quanto riguarda l'incidenza è il più comune delle neoplasie linfoidi, quindi saper parlare di linfomi diffusi delle cellule B durante l'esame è caldamente suggerito.

L'eterogeneità: i linfomi a grandi cellule B diffusi spaziano da forme molto simili o comunque collegabili al linfoma follicolare, e quindi appartengono a una possibile evoluzione del linfoma follicolare, fino a forme molto aggressive come il linfoma di Burkitt. Il linfoma di Burkitt è un tipo di linfoma diffuso B a grandi cellule, ma non è incluso nella classificazione insieme agli altri, è tenuto a parte.

Molti dei linfomi di questo tipo hanno un fenotipo e una derivazione identificabile con cellule del centro germinativo: quindi hanno marcatori B, ma anche marcatori del centro germinativo come CD10 e Bcl-6; sono stati fatti diversi tentativi di sub-classificazione mediante cocktail di marcatori, identificando due gruppi principali che sono quelli con caratteristiche del centro germinativo o cellule attivate. Quindi esiste una serie di valori che cercano di collegare alla prognosi queste eterogeneità. Le forme attivate, che non contengono marker correlati con il centro germinativo ma sono più verso la plasmacellula, sono più aggressive e meno controllabili dal punto di vista terapeutico.

In effetti, la prima suddivisione e identificazione di questi gruppi è stata fatta tramite tecniche di gene profiling, con le quali si può fare una casistica di linfomi: da tessuto-materiale fresco si estrae l'RNA, si fa un'analisi molecolare che identifica [mediante DNA microarray] una gamma molto elevata di geni (quindi si valuta l'espressione genica), quindi si osservano delle espressioni elevate, o non elevate, o non-espressione (rosso o giallo o verde nei pannelli); in definitiva si sono individuati due gruppi: quello con le caratteristiche del centro germinativo, e quello con le cellule B attivate. Con l'immunoistologia, con marcatori, si è tentato di trovare dei surrogati perché ovviamente il gene profiling è caso per caso piuttosto costoso e non applicabile.

È importante suddividere e identificare questi gruppi, perché nel momento in cui vediamo il survival in percentuale negli anni [il professore mostra un grafico che correla tipo di malattia e attesa di vita dei pazienti]: il sottotipo dei linfomi B diffusi a grandi cellule con fenotipo germinal center hanno una prognosi decisamente migliore e una sopravvivenza sicuramente migliore, rispetto a quello a cellule attivate.

È molto importante a livello della diagnosi anche identificare dei profili immunofenotipici, utili per monitorare la neoplasia in varie sedi (quindi sangue periferico, midollo, organi potenzialmente coinvolti); ho detto già l'altra volta come il carotaggio-biopsia [del midollo] è molto utile per la stadiazione, il monitoraggio e in alcuni casi contemporaneamente la diagnosi e il monitoraggio.

Vediamo un caso particolare: biopsia arrivata dall'Ematologia, T.L. #00-0175 m. (T.L. sono le iniziali, 00 sta per 2000) con le notizie cliniche di linfocitosi. L'ematologo per caratterizzare il processo nel suo protocollo diagnostico ha la biopsia osteomidollare, invia all'Anatomia patologica e in queste immagini (le trabecole sono in rosa, poi c'è il midollo ematopoietico e il grasso) si nota un nodulo linfoide. Il nodulo linfoide si caratterizza per:

- la grandezza del nodulo,
- il fatto che sia tondo e non diffuso,

- la posizione rispetto alle trabecole. Abbiamo visto l'altra volta come il linfoma follicolare spesso colonizza il midollo, adeso in prossimità delle trabecole e quindi paratrabelolare: in questo caso [T.L. #00-0175 m.] i noduli sono paratrabelolare ma anche paracentrolunari.

- piccoli elementi linfoidi.

Potrebbe essere una leucemia linfatica cronica, ma potrebbe anche essere una presentazione linfoma follicolare o un altro tipo di neoplasia. Se noi definiamo da un punto di vista diagnostico questo infiltrato, da un punto di vista morfologico possiamo descriverlo come infiltrato linfoide nodulare che suggerisce una localizzazione di processo linfo-proliferativo a basso grado di malignità.

I linfomi B si suddividono in linfomi indolenti (es. linfoma con leucemia linfatica cronica, linfoma follicolare) o aggressivi (es. linfomi B a grandi cellule), da un punto di vista prognostico; la classificazione ufficiale non prevede questa suddivisione, sono caratteristiche che si danno alle singole entità.

Questa diagnosi è attualmente non sufficiente, non è accurata né completa e sicuramente è corretta, ma insufficiente: noi dobbiamo dar un nome preciso.

La morfologia assolutamente non riesce: abbiamo un profilo [*dice che è stato trattato nella lezione precedente*], abbiamo un CD20 e un'organizzazione nodulare con aggregati più o meno grandi [*si riferisce agli aggregati marroncini*], il profilo immunofenotipico si dice che sia B (CD79 e CD20) però ha co-espressione di CD5 ad alta intensità, e anche espressione nucleare della ciclina D1. Con questi tre marcatori il bersaglio può essere colpito precisamente: è un linfoma a cellule del mantello, diagnosi e anche stadiazione (è localizzato nel midollo).

Il linfoma a cellule del mantello è un sottotipo, un'entità nosografica a sé stante, in molti pazienti da una localizzazione wild spread (è facile trovarlo leucemico, trovarlo che colpisce numerosi linfonodi).

Esiste una forma particolare che colpisce il sistema gastrointestinale, che si chiama poliposi linfomatoide: è una presentazione piuttosto tipica del linfoma a cellule del mantello extranodulare. È uno dei linfomi più pericolosi, meno trattabili pur essendo a piccole cellule o a cellule intermedie (non ci sono tante mitosi, non c'è un'aggressività biologica), è un linfoma che non si riesce a curare facilmente. La sua mutazione genetica è la traslocazione in 11 – 14 [*si riferisce ai cromosomi, t(11;14)*] che porta a iper-espressione non controllata della ciclina D1.

Voi sapete che il ciclo cellulare è regolato da vari fattori, varie proteine: le cicline sono le proteine che spingono la proliferazione, ci sono degli inibitori (p16, p21, p56 che inibiscono il ciclo cellulare), le cicline e le chinasi ciclina-dipendenti controllate con gli inibitori, e alla fine in rapporto stechiometrico tra le varie forme determina la tendenza proliferativa di una popolazione cellulare. Le cicline sono di diverso tipo (ciclina D1, D2, D3) e il sistema linfoide non usa mai la ciclina D1, usa le cicline D2 e D3: quindi la traslocazione (11;14) porta il gene della ciclina D1 che non è mai acceso nei linfociti, a essere non solo acceso ma anche costitutivamente attivato e funzionale perché si attacca ai geni per le immunoglobuline (che sono geni sempre accesi nei linfociti B). Quindi si ha una de-regolazione del ciclo cellulare con un vantaggio clonale.

Domanda: 'Non ho capito: insieme alla ciclina D1, quali sono gli altri due markers del linfoma cellule del mantello e della biopsia midollare?'

Risposta: 'I marker sono i marker B (CD79, CD20), non ha il marcatore dei CD10 (marker delle cellule centro-follicolari), non ha il CD23 (che è un altro marker presente in alcune proliferazioni linfo-proliferative, e in particolare la leucemia linfatica cronica e che caratteristicamente esprime questo marcatore), esprime il CD5 che un marker dei linfociti T (che è anche espresso dalla leucemia linfatica cronica). Però avendo il CD5, ma non il CD23, più la ciclina D1 le caratteristiche sono abbastanza semplici ed è anche molto robusto come profilo immunofenotipico; è una diagnosi che, con le tecnologie correnti, è diventata facile.'

Vediamo che la malattia ha a una bassa frequenza di remissione completa, bassa risposta [*il professore scorre la slide 'MCL', da guardare*], è aggressivo, con la terapia evoluta in questi ultimi anni è un po' migliorata la prognosi dei pazienti trattati con nuovi protocolli, ma comunque la prognosi resta infausta.

[*Scorre le slide, dice di guardarle da soli*]

Passiamo a un altro processo linfo-proliferativo: la **HAIRY CELL LEUKAEMIA (HCL)**.

La HCL è caratterizzata da caratteristiche morfologiche molto peculiari: ha un nucleo intermedio più o meno grande come un linfoma a cellule del mantello, un po' più grande di quello della leucemia linfatica cronica, ma a differenza di quest'ultima il citoplasma non è poco rappresentato, ma è ampio e caratteristicamente sfrangiato. Per cui in contrasto di fase si notano protusioni-escrescenze, per cui è stato definito a hairy cell (cellule capellute): ciò perché la sua morfologia in citologia su sangue periferico e su sangue midollare è abbastanza caratteristica.

Sono cellule B che hanno un fenotipo corrispondente a quelle di memoria [*'di memoria' è dubbio, audio disturbato*] e sicuramente opposto al follicolare, e un processo linfo-proliferativo caratterizzato da una fibrosi midollare molto spiccata e da splenomegalia: quindi non è infrequente avere in Ematologia una biopsia osteo-midollare con un sospetto di mielofibrosi, splenomegalia, dry tap midollare (cioè non si ottiene niente); e invece la risposta è una HCL, ovviamente una patologia totalmente diversa. Spesso c'è una citopenia (che può essere oligocitopenia, pancitopenia, costantemente neutropenia e monocitopenia), deficit immunitari, può esserci una frequenza maggiore a infezioni e sicuramente si può avere una insufficienza midollare con un midollo diffusamente sostituito da fibrosi e infiltrazione di cellule capellute.

La diagnosi si fa nella maggior parte dei casi su biopsia osteo-midollare o, nei casi in cui la componente leucemica sia fortemente rappresentata, anche in periferia con la morfologia e la citometria a flusso.

Profilo immunofenotipico: morfologia e profilo immunofenotipico sono sempre molto strette, il profilo è quello di cellule B (CD20+, CD22+) che hanno anche l'espressione caratteristica di alcuni marker tra cui il CD11c (marker presente nei macrofagi) e

il CD25 (che è una catena del recettore per IL-2 e anche prodotto in grande quantità nel siero e si accumula, quindi ci può essere un supporto dall'analisi con metodi di immunochimica es. ELISA) e il CD103. Le infezioni possono essere severe e importanti, ci sono diversi tipi di terapie e di cure [illustra la slide 'Symptoms and Signs' e la lascia alla nostra lettura] a seconda delle diverse caratteristiche cliniche della malattia. Si tratta di una malattia indolente, le terapie sono di controllo progressivo della malattia in dipendenza dalla sintomatologia e delle patologie più correnti.

[illustra la scheda generale 'HCL'] caratteristiche generali:

- età maturo-anziano, come tutti i processi linfo-proliferativi, trovare un giovane con HCL è piuttosto raro. La leucemia linfoide cronica ha la stessa distribuzione e da lo stesso linfoma follicolare, tuttavia esiste la forma pediatrica; i linfomi B diffusi a grandi cellule sono spostati sopra i 50 anni e tra i linfomi B a grandi cellule quelli più giovanili sono nelle forme mediastiniche, molto aggressive ma curabili e guaribili, finché sono localizzate [nella parete gastrica, credo ma l'audio è disturbato].
- splenomegalia costantemente e anche molto notevole: la milza è piena di hairy cellule che sostituiscono completamente la struttura splenica formando degli pseudoseni, dove i seni non sono più bordati da cellule ['duttale', parola dubbia] e macrofagiche, ma sono circondate dalle cellule B che evidentemente hanno alcune caratteristiche simili ai monociti e specifiche a formare delle reticolazioni.
- citopenie: monocitopenia sempre e costante (100%), neutropenia (90%), PTL (80%), pancitopenia (70%). La valutazione dell'infiltrato midollare è quantitativa, per cui abbiamo un indice di sostituzione midollare da parte delle hairy cell, che si fa moltiplicando in una formula la percentuale di sostituzione con la cellularità del midollo. Quindi in un midollo molto cellulato e molto sostituito il suo estremo è 100%, tutte hairy [intende che c'è completa sostituzione da parte delle hairy cells] e gradualmente si può scendere; ovviamente maggiore è la quantità di malattia, più cauto sarà l'anatomo-patologo a valutare le corrispondenze con i deficit funzionali midollari.
- fibrosi costante.
- l'evenienza di dry tap (punctio sicca) varia a seconda della quantità di malattia presente nel midollo.
- il fenotipo: CD20, CD25...

[il professore illustra una slide delle hairy cell]

Citomorfolgia: i fenotipi possono essere più o meno estesi, per vedere quali sono i principali si può usare la citometria flusso per dimostrare la presenza di cellule con questo fenotipo con precisione abbastanza notevole.

Nella slide si vede la morfologia a livello del midollo evidenziata con il CD25, il CD20, e con trama reticolare (con una colorazione speciale per reticolina si evidenzia l'ispessimento della trama reticolare, da cui la definizione dell'ispessimento).

[slide 'BRAF Mutations in HCL', il professore introduce la slide dicendo che c'è stata collaborazione anche da parte di Verona] Per quanto riguarda la patogenesi: il vantaggio proliferativo della HCL è dato da alcune mutazioni nell'oncogene BRAF (che codifica per B-Raf), oncogene che si vede spesso e nella stessa mutazione nel melanoma, nei nevi, in alcuni carcinomi della tiroide, in alcuni carcinomi dell'ovaio, in alcuni carcinomi del polmone. I più costanti come forme neoplastiche collegate a questa mutazione sono la HCL (in cui è in pratica 100%), l'istiocitosi a cellule di Langerhans (in cui è quasi tra il 50-60%), il carcinoma della tiroide (molto frequente).

Domanda: Non ho capito qual è la cosa in comune tra carcinoma dell'ovaio, carcinoma del polmone...

Risposta: Avrete fatto in patologia gli oncogeni e i tumor suppressor gene, che sono situati strategicamente nel pathway molecolare che regolano il ciclo cellulare, l'apoptosi, la senescenza... spesso sono dei recettori e così via... nel momento in cui avviene una mutazione che scardina questi meccanismi regolatori, il clone che si genera può avere un vantaggio o di proliferazione o di perdita del controllo sull'apoptosi. Il tipo di tumore che viene determinato ovviamente dipende dal tipo di cell in cui avviene questa mutazione: se l'oncogene BRAF viene mutato in cellula nevica (o in un precursore della cellula nevica a livello della cute), succede che perde il controllo e prolifera e questa proliferazione la chiamiamo 'nevo'. L'attivazione dell'oncogene stimola la senescenza cellulare e il suo controllo, si blocca il ciclo cellulare perché si iper-esprime il blocco del p16 inibitore e il nevo resta un tumore benigno.

Nel momento in cui si rompe il meccanismo di controllo, può diventare melanoma e conserva ovviamente la mutazione BRAF, ma anche altre alterazioni. Il BRAF è uno degli oncogeni più frequentemente mutati, specialmente nel [?] e da dei vantaggi che devono essere associati ad altre alterazioni genetiche. Se è singolo o accompagnato da altre mutazioni poco significative (come nel nevo e nella HCL), producono una neoplasia delle cellule in cui è avvenuto all'inizio questa alterazione: quindi in un precursore B, la mutazione BRAF produce la HCL. La stessa mutazione in un precursore di macrofagi (quindi monocita, pro-monocita), produce un'altra malattia che si chiama malattia di Erdheim-Chester: in cui c'è accumulo di macrofagi, che hanno un vantaggio proliferativo o di resistenza e di indipendenza dal microambiente, legato a questa alterazione, che non è sufficiente a far diventare un tumore maligno, però lo fa diventare una popolazione capace di produrre una malattia. Se la stessa mutazione colpisce un precursore che è sempre della famiglia del monocita (linea mielo-mono), ma che è già committed per diventare una DC di Langerhans, diventa una istiocitosi a cellule di Langerhans che ha molto frequentemente la stessa mutazione. Se il precursore è una cellula dell'epitelio tiroideo ed evidentemente con altre alterazioni, produce un carcinoma della tiroide. Quindi: il gene è lo stesso, però il contesto e la stem cell neoplastica in cui avviene sono diversi.

Altra cosa è la mutazione a bcr-abl al precursore linfoide, che permette di differenziare quel clone dalla leucemia mieloide cronica; quando avviene un'altra mutazione a livello del precursore alterato può dare crisi blastica. [l'audio è confuso, ma comunque il professore commenta solo l'importanza di quanto appena detto]

Man mano che la eterogeneità dei processi proliferativi si va a capire meglio, si ha sempre la possibilità di definire con più precisione la patogenesi molecolare e questa spesso da anche delle armi terapeutiche, per cui per il BRAF esistono dei farmaci che sono degli inibitori della sua azione patogenica (che sono in sperimentazione per il melanoma). Ovviamente per l'HCL ci sono altre terapie efficaci e non necessariamente di tipo biologico, come per il melanoma, mentre invece una terapia molecolare costosa-efficace-precisa è più indicata.

Tra gli altri processi linfo-proliferativi degni di nota: il **Lymphoplasmacytic lymphoma**.

Il linfoma linfoplasmacitico, spesso a IgM, colonizza frequentemente il midollo con una doppia componente linfocitaria e plasmacellulare: quando le plasmacellule clonali si associano a un'importante componente B (in noduli o in infiltrazione interstiziale diffusa), la diagnosi è di linfoma linfoplasmacitico ed è diversissima da quella che di mieloma.

Bisogna stare attenti a non confondere il linfoma linfoplasmacitico ed il mieloma. Il mieloma è una malattia molto severa e molto eterogenea con crolli vertebrali, patologia renale, è una malattia molto eterogenea ma che ha un gruppo molto severo di forme.

Invece il linfoma linfoplasmacitico è considerato un linfoma indolente; è spesso assimilabile alla malattia **di Waldenström**, perché le plasmacellule neoplastiche più frequentemente producono IgM (invece nel mieloma le plasmacellule neoplastiche quasi sempre producono IgG; e questo aiuta anche nella diagnosi differenziale).

Può essere collegato a malattie autoimmuni o malattie dis-immunitarie, è un parente del linfoma a cellule della zona marginale: è un linfoma più frequentemente indolente, sempre collegato con malattie autoimmuni (come la Sjögren, la tiroidite) o anche infezioni croniche (come l'Helicobacter nel MALT gast).

Mieloma multiplo: malattia eterogenea e molto severa quando coinvolge pesantemente il midollo, quindi distruggendo una grossa parte della componente ossea e dando importanti complicanze a livello renale (si possono avere una serie di insufficienze renali molto severe), può essere associato ad amiloidosi, e lo stesso la sua situazione è molto critica.

Il mieloma è un tumore delle plasmacellule, è anche detto mieloma plasmacellulare: 'mieloma' vuol dire midollo, il plasmacitoide non-midollare non è un mieloma (è più parente del linfoma a cellule della zona marginale e del linfoma linfoplasmacitico).

È il 10% dei tumori patologici e rappresenta la seconda forma in frequenza negli Stati Uniti.

[slide MYELOMA, poi scorre le slide ma credo intenda che dobbiamo darci una letta noi]

Fa parte dello spettro peggiore dei disordini che consideriamo discrasie plasmacellulari.

Esistono delle proliferazioni plasmacellulari midollari (quindi parenti del mieloma, in un certo senso) che si chiamano

Gammopatie monoclonali, in cui si evidenzia la presenza di immunoglobuline clonali nel siero (talvolta per le catene leggere) e la diagnosi di queste si basa su criteri maggiori-minori in cui la diagnosi istologica rappresenta una delle componenti. Nel momento in cui troviamo anche localizzazione, sostituzioni da parte di plasmacellule clonali è sufficiente per fare la diagnosi di mieloma.

[il professore dice che sul mieloma si possono trovare molti dettagli] Mi raccomando la distinzione tra gammopatia monoclonale e leucemia: è una situazione frequentissima, si parla di 5-10% di persone che possono avere una componente monoclonale, che va distinta e seguita nel tempo perché alcune di queste sono degli smoldering mieloma (lo stato tranquillo, che a un certo punto può evolvere oppure il mieloma può partire da solo senza la fase di smoldering prima, e di solito sono i più giovanili e aggressivi).

Nel mieloma l'alterazione delle plasmacellule è correlata a

- una dipendenza da IL-6, quindi ci sono delle correlazioni molto interessanti con disordini collegate alla iper-produzione di IL-6 (come la malattia di Castleman).

- un aumento o comunque una dipendenza dall'angiogenesi che giustifica l'utilizzo di farmaci anti-angiogenetici (come il talidomide nella terapia del mieloma).

Il quadro radiologico è caratterizzato da lische ossee: i quadri sono osteolitici nella maggior parte dei casi, in evenienza possono esserci dei mielomi che appaiono come osteoaddensanti. La morfologia è quella delle plasmacellule.

Come vedete un campo molto complicato nella sistematica, molto ampio ed eterogeneo: nel caso dei linfomi, neoplasie ematologiche in generale, la criticità è notevole perché le terapie possono essere molto importanti per il paziente se i protocolli sono guidati da una diagnosi di certezza e precisione. Un errore diagnostico anche apparentemente non importante può fare la differenza in modo significativo.

I linfomi come prevalenza sono di tipo B, ma esiste una famiglia di linfomi di tipo T che sono sempre classificati con la WHO: controparte normale, controparte funzionale può essere anche fatta corrispondere a processi da distinguere con precisione. La divisione tra linfomi T a cellule precursori e cellule mature, tra linfomi B a cellule precursori e cellule mature: i precursori T sono essenzialmente timici, perché nel timo si sviluppa l'ontogenesi della linea T, e sono spesso in fase mediastinica e spesso però si presentano come leucemie linfoblastiche T che possono colpire i bambini più giovani ma anche le persone adulte.

Un giovane con massa mediastinica radiologicamente individuata può avere diverse patologie: nella diagnosi differenziale il clinico si pone di fronte a un paziente in cui in qualche modo si è arrivati alla definizione di un processo proliferativo a livello del mediastino (il mediastino si divide anatomicamente in antero, superiore, posteriore...). I tipi di tumori diversi che si sviluppano nelle diverse sedi sono collegati alla natura del tumore: i linfomi linfoblastici, e i linfomi in generale, sono tutti collocati nel mediastino anterosuperiore, cioè nella loggia timica; i linfomi T linfoblastici nascono nel timo e quindi è facile che abbiano una localizzazione timica. Nel momento in cui si voglia arrivare alla diagnosi, in alcuni casi in modo non cruento (non aggredendo il mediastino), si deve prima fare una analisi del sangue periferico e del midollo (che sono più facilmente aggredibili) per evidenziare eventuali localizzazioni. Sottoporre un ragazzo alla mediastinoscopia diagnostica, che è piuttosto complicata e densa di potenziali complicazioni, per arrivare alla diagnosi di linfoma T linfoblastico che era localizzato nel midollo è una malpractice; quindi prima si analizzano il sangue periferico e il midollo: se si trovano linfoblasti T, la diagnosi è quella di leucemia linfoblastica T o a cellule T precursori, e dato che la massa mediastinica sarebbe evidentemente correlata (perché è molto improbabile che sia un'altra patologia), allora la diagnosi può essere considerata facile; se non c'è nulla nel sangue e nel midollo, e c'è la massa mediastinica, le ipotesi e le considerazioni sono quelle di linfoma di Hodgkin (che solitamente, soprattutto nei giovani, localizza nel mediastino anterosuperiore) o linfoma T a cellule diffuse nel mediastino o linfoma B a cellule diffuse nel timo.

Torniamo ai linfomi T: sono diversi, sono complessivamente minori dei linfomi B (quindi nel caso di processo linfoproliferativo morfologicamente identificato, è più probabile che sia B che T ma la probabilità non è sufficiente).

Domanda: Lei ha detto, nel caso in cui il paziente dovesse avere dei linfonodi mediastinici fossati, prima di fare una biopsia osteomidollare dovremmo chiedere gli esami del sangue periferico: noi ci limiteremo a fare l'emocromo o fare anche altre...

Risposta: Un paziente con massa mediastinica si gestisce in un modo un po' particolare, perché è sicuramente una cosa importante: l'emocromo che viene chiesto dall'ematologo o comunque l'accertamento è molto approfondito, quindi si cercheranno anche piccole popolazioni potenzialmente presenti di linfoblasti. Quindi si potrà fare una analisi citometrica con TDT o CD3, o un marcatore di maturità... Si farà una analisi della componente T approfondita.

Molto frequentemente non troveremo niente, perché sarà un Hodgkin o un'altra cosa. Però comunque anche se ipotesi rara, essendo una procedura molto poco invasiva, va fatta prima.

L'eterogeneità delle forme mature si basa sulle caratteristiche morfologiche e funzionali del clone T espanso, quindi avremo delle forme identificabili con localizzazioni particolari: per cui avremo la micosi fungoide e la sindrome Sezary, sono processi linfoproliferativi T che colpiscono il distretto cutaneo, in particolare sono cellule CD4+ (quindi T helper, caratterizzati da un profilo caratteristico ma non distintivo) che infiltrano in modo caratteristico dell'epidermide una infiltrazione epidermotropa, troviamo i linfociti T all'interno dell'epidermide (quindi all'interno dei cheratinociti). La micosi fungoide e la sindrome di Sezary sono due fasi di una sindrome considerata più o meno unitaria: la sindrome di Sezary è molto più aggressiva di una leucemia che segue la micosi fungoide.

Poi abbiamo in altri distretti: enteropathy associated T-cell lymphoma, una malattia linfoproliferativa T che da una enteropatia collegata in qualche modo, o almeno era considerata correlata, a malassorbimenti in diagnosi differenziale con la celiachia ed è in distretto gastroenterologico.

Un altro linfoma abbastanza collegabile a un organo è il nasal type NK/T cell lymphoma: linfoma a cellule NK/T, costantemente caratterizzato dalla presenza di infezione da EBV (l'EBV è di solito un virus linfotropico che colpisce i linfociti B tramite un recettore caratteristico che è il CD3B receptor), che in alcune occasioni riesce anche a colonizzare i linfociti T e quindi ha vantaggio proliferativo, si esplica in un linfoma aggressivo e mortale nella maggior parte dei casi. Può essere localizzato anche in altre sedi del sistema respiratorio e può presentarsi in forme polmonari, quindi tra i processi linfoproliferativi del polmone il nasal type è un linfoma raro, come tutti i linfomi extranodali, molto aggressivo e caratteristico.

Altri tipi di linfomi: epatosplenico, Subcutaneous panniculitis-like T cell. Lymphoma (che infiltra con la panniculite in sedi profonde); sono tutti i linfomi molto aggressivi e mortale, se non prontamente curati.

Come più frequenti ci sono:

- linfoma angioimmunoblastico, prende il nome dalla morfologia linfonodale extranodale. Visivamente si associa a una proliferazione vascolare del linfonodo in particolare delle venule a endotelio alto, che sono le porte d'accesso e di trasmigrazione dei linfociti dal sangue periferico al linfonodo, e si accompagna a una proliferazione di immunoblasti T, che non sono neoplastici, quindi è una proliferazione T che induce alterazione del microambiente, proliferazione dei vasi e cellule T. Quindi lesioni complicate da diagnosticare e che corrispondono a linfomi prognosticamente piuttosto impegnativi.

La classificazione, come per linfomi B, prende dei numeri: es. T prolymphocytic leukemia è 9834/3 (il 3 significa neoplastico maligno nella classificazione della WHO).

Un altro linfoma a cui potreste dover rispondere è il linfoma anaplastico a grandi cellule T o Alkoma, di cui è nota la patogenesi molecolare.

[torna con la slide del Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: un un po' di approfondimenti] Tornando al linfoma a cellule T angioimmunoblastico, è considerato una entità separata come linfoma a cellule T periferici non altrimenti specificati; quindi nella classificazione che i linfomi NOS (Non Otherwise Specified) è una scatola in cui si mettono tutti i linfomi T periferici (nel senso a cellule T periferiche, quindi non a cellule T timiche) che non siano classificati in questa classificazione. Quindi l'extranodal NK/T lymphoma nasal type non è un linfoma a cellule T periferiche NOS, infatti il suo numero classificativo è diverso da quello dei linfomi a cellule T periferiche NOS.

Alcune di queste diagnosi sono critiche per la prognosi e la terapia, altre lo sono meno, sicuramente in generale i linfomi T sono molto più aggressivi dei linfomi B, a parte la micosi fungoide (prima che diventi l'evoluzione più aggressiva) e anche alcune forme di proliferazioni a cellule T granulari (che sono delle proliferazioni di cellule NK, non particolarmente aggressive); più o meno gli altri sono tutti piuttosto bruttarelli.

[scorre alcune slide]

[immagine, linfoma angioimmunoblastico] il CD20 ci evidenzia il residuo B: si vede che la popolazione B è tutta schiacciata sulla capsula e all'interno c'è tutta questa popolazione di cellule più grandi CD3+. Il marker che lo identifica con precisione (sono stati cercati diversi marker, CD57, CD10 ma che sono stati scartati come poco riconducibili) è il PD-1, marker molto importante per la definizione di queste forme.

Del PD-1 ne abbiamo parlato l'altra volta come un marcatore importante anche per l'immunità, per la regolazione, e marker per le cellule T del centro germinativo (che fanno parte di quel microambiente che regola la selezione clonale dei linfociti B all'interno del centro germinativo e permette la proliferazione di cloni capaci di produrre immunoglobuline ad alta affinità).

L'angioimmunoblastico è sostanzialmente un linfoma CD4, si vedono le cellule tipiche come popolazione di bordo delle cellule B (sono grandi e atipiche, le possiamo riconoscere come non normali anche nella morfologia e la presenza di questo marcatore ci definisce la linea cellulare, e quindi la caratteristica).

Sta crescendo tutta una serie di segnalazioni e di definizioni di un gruppo di linfomi caratterizzati da il fenotipo con caratteristiche delle cellule T del centro germinativo [indica sulla slide 'CLINICAL REPORT']: 'primary' sta per primitivo, che nasce dalla cute. Il Primary Cutaneous Follicular Helper T-cell Lymphoma non è un linfoma B follicolare, è un linfoma T follicolare: caratterizzato

da PD-1, con overlapping features (aspetti di sovrapposizione) e (?) angioimmunoblastico. Questa è una forma simile come biologia, ma localizzata alla cute.

Vediamo immagini piuttosto impressionanti di malattie severe, che vengono classificate: noi stiamo facendo la sistematica, cioè questo processo di definizione precisa delle varie malattie (più frequenti, più rare...) e la separazione l'una dall'altra seguendo un criterio prognostico e criteri di priorità. Considerando il fatto che quando affronteremo pazienti, singoli uno per uno, quando si presentano non si presentano messi nella loro scatola: noi dobbiamo avere le conoscenze sufficienti per arrivare alla diagnosi nel tempo minore, usando i sistemi e i protocolli diagnostici più precisi, meno costosi, meno cruenti, meno nocivi per il paziente. Se non avrete una conoscenza sufficiente dell'eterogeneità delle malattie [*lui si riferisce ai linfomi, ma vale anche per il dermatologo, le anemie...*], potreste fare dei danni non riconoscendo velocemente come orientarsi.

La descrizione delle malattie, peraltro, porta anche a una acquisizione sempre più precisa e maggiore delle conoscenze sulla biologia e la fisiologia: per cui immunodeficienze primarie sono una sorta di 'esperimenti di natura', di solito malattie pediatriche in cui manca qualcosa a livello di un particolare subset di linfociti o di macrofagi o mancano le citochine o di recettori, per cui tutto questo produce una serie di effetti in negativo (deficit immunitari molto specifici) che poi possono essere utilizzati per capire come funziona normalmente il sistema immune. Quindi lo studio delle immunodeficienze ha portato a grandi conoscenze sul modo in cui funziona il sistema immune; lo stesso, la trasformazione neoplastica di alcuni di questi passaggi della differenziazione del sistema linfoide, e non solo, porta all'aumento di conoscenze. Sempre deve esserci questo travaso tra questi vasi comunicanti.

Quindi la conoscenza della patogenesi: vediamo che questi linfomi caratterizzati da questo fenotipo peripheral T-cell germinal center (T helper follicolari) hanno prognosi particolarmente critiche e hanno un aumento di frequenze di particolari mutazioni (come può essere questo TET2).

[slide 'BRIEF REPORT – TET2'] Vedete come si accumulano queste informazioni: ovviamente sarà l'ematologo, il patologo che userà queste cose specialisticamente a usarle nel dettaglio; ma il corpo della classe medica deve essere conscio la complessità che non delega totalmente agli specialisti la gestione di queste informazioni.

Il PD-1, oltre che un marker per i linfomi o per i linfociti, è anche una molecola che ha una sua funzione: come il CD4 nelle cellule dei recettori dell'HIV, il CD21 recettore di un altro virus, il PD-1 è una molecola regolatrice del sistema T helper in senso inibitorio (per cui ci sono tutte le informazioni attualmente in sviluppo sulla manipolazione dell'espressione di questo recettore nel sistema immune, per cui inibirlo correla con la riattivazione del sistema immune utilizzabile nel combattere alcuni tipi di tumori). Per cui l'anti-PD1 antibody (cioè un farmaco anti-PD1) è utilizzabile in oncologia per combattere il tumore: per cui vedete il linfoma che esprime PD1 e l'anti-PD1 come modulatore, quindi blocco del PD-1 e prognosi di immuno therapy for HIV o blockade of PD-1 (che vuol dire [Programmed cell death-1](#)), questi sono dati sperimentali. [Ciò promuovere la capacità soppressiva dei CD4](#) proteggendo da malattie lupus-like e quindi nei tumori, nel HIV, nelle malattie autoimmuni.

Probabilmente quando uscite, se questi studi vanno avanti, ci sarà un farmaco che userete contro il PD-1 (in queste malattie oncologiche, malattie virali...); quindi allerta che siete sempre sulla frontiera.

[Il professore dice di voler fare Hodgkin, salta il linfoma anaplastico a grandi cellule].

Il linfoma anaplastico a grandi cellule è caratterizzato dal CD30, come marker importante, e il p80 o Alk, perché proteina ibrida che si genera dalla traslocazione (2;5) che caratterizza questo linfoma; linfoma abbastanza frequente, curabile, c'è la forma cutanea a bassa aggressività e che si può confondere con varie altre malattie, tra cui metastasi perché è un linfoma che può colonizzare i linfonodi in modo simile metastatico [*il professore indica degli aggregati nei seni: indica la distinzione tra una metastasi da carcinoma, realizzata con la creatina, e una manifestazione linfonodale col CD30; ma se ci basiamo sulla morfologia e possiamo confondere l'uno con l'altro*].

Il fenotipo può essere evidenziato con grande precisione e localizzazione midollare.

I linfomi si dividono in Hodgkin e non-Hodgkin, la divisione è storica.

Linfoma di Hodgkin: è oggi considerato un linfoma delle cellule B e si divide in due sottogruppi: il tipo classico, più frequente e più aggressivo generalmente, e un linfoma nodulare a predominanza linfocitaria.

I due gruppi possono essere distinti biologicamente dalla evidenza che il linfoma nodulare a predominanza linfocitaria a tutte le caratteristiche della cellula B matura (le cellule neoplastiche), mentre le forme classiche le cellule di Sternberg e le cellule di Hodgkin che sono cellule neoplastiche hanno caratteristiche B fortemente difettive. Quindi abbiamo una patogenesi diversa, sono linfomi diversi anche se associati per definizione storica nel linfoma di Hodgkin.

Linfoma caratterizzato molto precocemente, e distinto dagli altri molto precocemente nella storia, perché alla morfologia appare subito diverso dagli altri: ci sono queste cellule grosse, che si chiamano 'di Reed- Sternberg' (i due patologhi che le hanno descritte per la prima volta), caratterizzate non da un solo nucleo ma da più nuclei (in sezione spesso macronucleoli) e spesso isolate in un ambiente molto eterogeneo di tipo infiammatorio (eosinofili, macrofagi, plasmacellule), per cui è stato anche chiamato granuloma maligno (sembrava un linfogranuloma maligno). Storicamente Hodgkin era 1798-1866, non si sa bene quanti di quelli descritti da Hodgkin fossero veramente [*di classificazione Hodgkin*] perché non c'era l'istologia, ma ne conserva il nome: vedete alcuni aspetti della malattia a livello dell'ghiandole assorbenti, che sarebbero i linfonodi. Diciamo che la classificazione della separazione delle varie forme è stata piuttosto precoce: N.Eng.J.Med 1944 e già lo divide in paraganuloma, granuloma e sarcoma, che grosso modo corrisponde alla subclassificazione che abbiamo ancora adesso che deriva con piccole modificazioni da quella del '66 [*le quattro varianti:*] predominanza linfocitaria, sclerosi nodulare, cellularità mista, depressione linfocitaria. Come già detto la morfologia è molto caratteristica, ancora oggi molti patologhi fanno diagnosi solo morfologica, è imprudente ma lo si può fare come lo si poteva fare.

[mostra una slide con la scheda sull'incidenza]

Per quanto riguarda la distribuzione è un processo che si espande per distretti linfatici, può anche uscire dal distretto linfatico e quindi andare a configurare degli stadi diversi. [*scorre delle slide che ci indica per la lettura*]

La prevalenza linfocitaria e nodulare, è diverso dal punto di vista biologico ma anche dal punto di vista clinico: quindi la distinzione tra forma classica e forma nodulare a prevalenza linfocitaria e critica.

All'interno della forma classica distinguere: cellularità mista e sclerosi nodulare (la maggior parte), o altre come la depressione linfocitaria e altre subforme che sono più rare; la definizione importante è classic type o Hodgkin linfoma.

La forma nodulare indolente, molto più indolente della forma classica, e la sopravvivenza a lungo termine è comune, ha alcuni aspetti distintivi: la distribuzione per età è unimodale, a differenza di quella del Hodgkin classico che è bi-modale (ciò significa che abbiamo un picco giovanile e un piccolo senile). Queste differenze dall'Hodgkin classico sono strettamente correlate alla patogenesi: nella forma giovanile è prevalente la forma legata all'infezione con EBV, a stati di immuno-insufficienza (data da questa infezione) e spesso l'Hodgkin ha l'EBV all'interno delle cellule Reed- Sternberg, EBV clonale e quindi si ha una malattia clonale in cui il ruolo dell'EBV è certamente significativo (però non in tutti i casi, solo in un gruppo). Questa eterogeneità ha fatto confondere non facendo capire i meccanismi patogenetici della forma classica non-Hodgkin: la forma nodulare non ha mai EBV, è un'altra cosa.

[La forma nodulare] è un linfoma B con tutte le caratteristiche, se guardiamo la morfologia: abbiamo lo sviluppo all'interno di follicoli linfatici, le cellule neoplastiche del linfoma di Hodgkin NLP (Nodular lymphocyte predominant) sono cellule che hanno le caratteristiche del centro germinativo, sono una specie di centroblasti mal cresciuti, clonali, che si mischiano e si trovano sempre all'interno di strutture nodulari (appunto Nodular lymphocyte predominance) costituiti da linfociti B policlonali. Quindi la caratteristica anche di questo Hodgkin è di avere poche cellule blastiche in un microambiente ricchissimo di altre cellule: per capire questo ci sono voluti decenni e decenni di studi.

Le cellule neoplastiche di questa forma, dette anche LH (lymphocyte hystocyte) o 'pop-corn' [il professore indica una immagine]: qui sono evidenziati i marcatori bcl-6 (che è quello dei citoblasti dei centri germinativi), [le cellule pop-corn] sono un po' twistate di taglia variabile (grandine, medie) e hanno tutti i marcatori dei linfociti B (CD20, CD79, CD19...).

È decisamente stato dimostrato che è una espansione clonale di cellule germinal center B post-follicolare, comunque con il livello di cellule... a livello di patogenesi molecolare si sono dimostrate più o meno le varie anomalie, non caratterizzate, e più raro e meno studiato (il linfoma classico è stato molto più studiato). Di notizie su questo linfoma follicolare non ce ne sono tantissime. Deriva e corrisponde a cellule del centro germinativo, il microambiente è quello del follicolo linfatico e mischiato ad altre cellule B follicolari, [audio disturbato] le cellule T follicolari sono spesso numerosissime e associate a questi follicoli anormali.

La forma classica, invece, per molto tempo non si è capito quale fosse la controparte normale, perché mancano molti dei marker B e marker T, per cui si è fatta confusione con l'analisi dei marcatori in quanto non sono stati trovati dei marker molto robusti e sensibili (cioè che sono presenti in tutte le forme, in particolare il Pax-5 che è adesso utilizzato per identificare con precisione la malattia di natura B dell'Hodgkin classico e distinguerlo, per esempio, da linfomi a grandi cellule CD30+ e dallo stesso CD30 dell'Hodgkin, ma che sono T, e vanno distinte perché sono malattie totalmente diverse). Quindi la complessità risolta da un approfondimento sulle caratteristiche biologiche delle cellule neoplastiche.

Caratteristicamente un linfoma di Hodgkin classico vede poche cellule di Reed- Sternberg (polinucleate, macro-nucleolate, circondate da linfociti T che fanno una specie di rosetta), moltissimi sono i linfociti T che si associano (quindi talvolta può esserci un errore di considerare una proliferazione T, invece che un Hodgkin).

Il profilo immunofenotipico tipico è quello dell'espressione di CD15, che un marker presente anche nelle cellule mieloidi (per cui, per un certo periodo, si era sospettato che fosse a cellule mieloidi, ma non lo sono), il marker per eccellenza è il CD30 (che è un recettore di attivazione sui linfociti, cellule T attivate) che specifico e caratteristico per distinguere la potenziale natura Sternberghiana delle cellule.

Il CD30 è stato descritto per la prima volta nell'85 e fa parte di una famiglia di recettori, insieme al Fas, quindi molecole biologicamente piuttosto interessanti.

Per quanto riguarda la patogenesi: risulta difettivo il programma di differenziazione B di queste cellule, mancano molti fattori di trascrizione delle cellule B e che vengono anche usati in fase diagnostica.

La stadiazione è importante, si divide in 4 stadi (1,2, 3,4) a seconda della presenza di linfonodi:

[il professore indica l'immagine] in un distretto, in due distretti, anche in più di un linfonodo (qui si vede un pacchetto dalla stessa parte del diaframma) e se abbiamo più di un pacchetto almeno uno sopra e almeno uno sotto al diaframma passiamo alla fase tre (quindi il diaframma ci determina la stadiazione), e se va fuori da fegato, milza e midollo, diventa stadio quattro diffuso.

La stadiazione determina anche la prognosi: la stadiazione si fa con vari metodi, tra cui

- la stadiazione radiologica

- la stadiazione patologica, in cui all'esordio il linfoma di Hodgkin si localizza nel midollo osseo: per cui si nota spesso una ipercellularità, ma non è una ipercellularità fisiologica, ma è non un aumento del midollo emopoietico (proliferazione eritroide, mieloide, tutto) perché le cellule di Sternberg hanno la caratteristica di produrre una alterazione della produzione delle citochine, dei mediatori e dei fattori di crescita tra cui c'è CSF e altri fattori mielo-stimolanti. Quindi c'è un midollo ricco (già ricco perché spesso sono pazienti giovani), l'infiltrazione di cluster di linfociti T, con all'interno eosinofili e cellule atipiche riconoscibili con il CD30, ci determina la diagnosi di localizzazione di morbo di Hodgkin.

Il fenotipo è quello di una cellula B infettiva nel classic type, quindi non avrà Bob-1, CD2, CD20 espresso in modo variabile. La patogenesi molecolare è chiarita attualmente abbastanza bene, nel senso che riattivazione costitutiva del sistema NF-kB (molto importante anche per la produzione di citochine): per cui la stimolazione non controllata di questa pathway porta a una infiammazione cronica locale nel linfonodo e nelle altre cellule, sistemica e costitutiva. La alterazione è legata non a una singola alterazione, ma a una alterazioni che producono lo stesso effetto.

Le alterazioni note sono quelle della infezione da EBV (che produce stimolazione del NF-kB, producendo molecole stimolanti), ma anche alterazioni della pathway per inattivazione di inibitori e in alcuni casi abbiamo una alterazione inattivante dell'Ik-B (che è l'inibitore del fattore di trascrizione del NF-kB, [segue elenco], l'attivazione del Notch, l'amplificazione del gene REL...).

Quindi varie e diverse alterazioni che nello stesso precursore producono una unica alterazione a valle, collegata con l'alterazione microelementare e la sopravvivenza anomala delle cellule di Sternberg (che quindi possiamo considerare delle cellule zombie). Le cellule B che non hanno più il recettore per l'antigene di solito muoiono per apoptosi, queste alterazioni patogenetiche fanno sopravvivere anormalmente queste cellule che restando nel tessuto producono una cascata citochimica anormale e alterano l'immunità, il microambiente e producono il danno funzionale.
[audio disturbato, ma il professore dice che la lezione è finita]

Lezione di Anatomia Patologica del 28/11/2013 (1)

Sbobinatore: Marina Gaule
Revisore: Sebastiano Toniolo

CARCINOMA COLON-RETTO

Il carcinoma del colon-retto (CCR) è una malattia molto frequente, in Italia ci sono circa 36.000 casi nuovi l'anno con 20.000 nuovi decessi; e se si parla in generale dell'Unione Europea ci sono circa 220.000 nuovi casi ogni anno con circa 110.000 decessi. Quindi c'è ancora un'elevata mortalità per quanto riguarda il carcinoma colonrettale.

In Italia la sede più frequente di tumore nel maschio è il polmone, per la donna invece è la mammella, mentre il colonretto si pone sia per i maschi che per le femmine al secondo posto (c'è un errore sulla slide: la prostata non è 0%, ma 10%). Qual è l'obiettivo di questa lezione? Quello di parlare in generale dei polipi del grosso intestino, degli adenomi del grosso intestino, dei fattori di rischio e delle condizioni di rischio per lo sviluppo del carcinoma colonrettale (CCR), dell'adenoma cancerizzato e delle condizioni di rischio per l'adenoma cancerizzato, e dei fattori prognostici e predittivi dei carcinomi.

Che cos'è un polipo all'interno del grosso intestino? Un polipo è una qualunque proiezione localizzata sulla mucosa colica. Quando un endoscopista fa una colonscopia, qualunque proiezione rilevata viene descritta come polipo. Per la maggior parte i polipi sono di tipo epiteliale, infiammatorio o amartomatoso.

La prevalenza dipende dalla popolazione che viene considerata nello studio. In uno studio su 1050 polipi

- l'82% di queste lesioni erano adenomi,
- il 12% polipi iperplastici,
- con una percentuale nettamente inferiore [3%] i polipi infiammatori
- altri, meno frequenti [1,5%], erano mesenchimali, come i leiomiomi e i lipomi.

I polipi del colonretto si distinguono in:

- polipi neoplastici
- polipi non neoplastici.

Tra i polipi **non neoplastici** abbiamo:

i polipi iperplastici;

i polipi del gruppo infiammatorio: cioè se andate a vedere c'è una lesione a livello dell'epitelio di tipo infiammatorio diversa sia nella clinica, che nell'istologia e nel tipo di patologia associata (pseudopolipi infiammatori, polipi associati a malattie infiammatorie croniche, altri tipo i CAP polipi, ma sono molto specifici e l'importante è che voi vi ricordiate che ci sono diversi tipi di polipi e che in generale ci sono polipo infiammatorio e polipo iperplastico);

polipi amartomatosi, il cui nome deriva dalla definizione di amartoma: quando ci sono tutte le componenti del tessuto in maniera esagerata; quindi sono polipi non neoplastici sporadici, dove sono presenti in maniera esagerata quello che normalmente c'è nella mucosa. Se sono sindromici, si associano a prognosi peggiore.

Dal punto di vista delle lesioni neoplastiche invece abbiamo:

l'adenoma (il classico adenoma del grosso intestino);

il carcinoma polipoide, che si possono manifestare come un polipo, ma essere già dei cancri;

ci sono delle lesioni non epiteliali che possono essere linfoidi come un'iperplasia linfoide o una [neoplasia linfoide, dalle slide N.d.R.], o lesioni varie mesenchimali che però sono rare (neurofibromi, ganglioneuromi, leiomiomi, GIST cioè neoplasie dello stroma intestinale).

IL POLIPO IPERPLASTICO

Il polipo iperplastico è una lesione preneoplastica? Negli ultimi 7 anni si sta discutendo moltissimo su questo tipo di lesioni. Per definizione è sempre stata classificata come una lesione benigna e non neoplastica, in realtà il quadro non è così semplice, poiché sono comunque associati ad una popolazione cellulare ad alto rischio di trasformazione carcinomica: alcuni, a destra, sono associati ad alto rischio di trasformazione in cancro, e ci sono delle sindromi ereditarie iperplastiche dove il paziente ha un rischio di avere cancro. Quindi sono delle lesioni non neoplastiche, però si stanno considerando attualmente in maniera un po' differente. Il polipo iperplastico tradizionale non ha nessun rischio di trasformazione neoplastica. È una lesione che di solito sta nel colon distale e retto. Sono abbastanza frequenti. Si vedono endoscopicamente come delle piccole rilevatezze polipoidi lisce a capocchia di spillo di pochi centimetri, di solito cominciano a comparire dopo i 40 anni, sono silenti e spesso si riscontrano occasionalmente, dal punto di vista macroscopico sono delle piccole lesioni sessili massimo 1cm, hanno la così detta architettura serrata: vuol dire che io vedo un aspetto delle mie ghiandole come se leccato (?) e a fantasia di fiore; non è presente displasia, in quanto la displasia è una lesione pre neoplastica, e di solito la zona proliferativa del polipo iperplastico si localizza alla base (nella slide 8, l'immagine in basso rappresenta una colorazione immunoistochimica con Ki-67 che evidenzia la zona proliferativa). Questi però sono dettagli per i patologi, l'importante è che se un patologo fa una diagnosi di polipo iperplastico, ha fatto una diagnosi di lesione benigna.

POLIPO SERRATO

Il "fratello" del polipo iperplastico è il polipo serrato. Questa è un'area difficile di diagnosi per il patologo perché assomiglia moltissimo al polipo iperplastico dal punto di vista morfologico, ma ha un comportamento clinico differente, e questo è venuto fuori soprattutto negli ultimi anni. In realtà il polipo serrato è situato nel colon prossimale, nel colon destro, nel cieco. È più grande. Ha delle anomalie di proliferazione, nel senso che la componente proliferativa, che sono questi nuclei scuri che vedete (slide con immagine in cui viene ricercato il Ki-67), si distribuisce su tutta la ghiandola e non solo alla base delle cripte. Non solo, ha delle alterazioni genetiche differenti, nel senso che è associato a una maggiore frequenza di instabilità dei microsattelliti (MIN, N.d.R.), e si è visto che ha un rischio di trasformazione neoplastica. Cosa vuol dire? Se un patologo, in un esame endoscopico di un paziente che arriva per screening o asintomatico, fa una diagnosi di polipo serrato, non è che quella è una lesione neoplastica, ma il follow-up di quel paziente sarà come quella di uno che ha un adenoma, non di polipo iperplastico.

[Slide 10] Questa è un'immagine un po' complicata ma per farvi vedere come negli ultimi anni le cose sono andate un po' cambiando: mentre fino a una decina di anni fa l'unica lesione sicuramente responsabile dello sviluppo di carcinoma era il polipo adenomatoso, adesso si sono inseriti questi polipi serrati, che sono dei parenti dei polipi iperplastici, ma hanno delle alterazioni genetiche differenti, che portano alla possibilità di trasformazione ad adenocarcinoma, con una via patogenetica differente, ma portano sempre al cancro.

ALTRI POLIPI

Poi esistono altri polipi, ce ne sono moltissimi, ma questi sono abbastanza frequenti: se qualcuno di voi farà il pediatra, è il caso in cui arriva la mamma spaventata con bambini anche più piccoli di tre anni che dice di aver trovato una lesione rossastra nel togliere il pannolino al figlio. Bisogna tranquillizzarle perché sono lesioni benigne, che si possono trovare in individui anche fino ai 30 anni. Questi, poiché sono peduncolati, tendono a torcersi e cadere e quindi si possono trovare nelle feci. È prevalente situato al retto-sigma; non ha displasia; può causare sanguinamento e anemizzazione, di solito di qualche cm (1-3, ma anche 4). Dal punto di vista istologico è costituito da tessuto di granulazione infiammatorio e da delle ghiandole che sono dilatate e cistiche e non c'è displasia. Quindi è una lesione benigna. Macroscopicamente può sembrare una lesione adenomatosa e l'endoscopista se lo vede lo rimuove e lo manda al patologo come sospetto adenoma.

Qual è il ruolo dell'anatomopatologo nel CCR?

Ci sono 2 situazioni:

ci arrivano delle biopsie di polipectomie,

o ci arrivano pezzi operatori dove la diagnosi è già stata fatta.

In caso di **biopsie** dobbiamo identificare le lesioni pre neoplastiche e quindi dare delle indicazioni a quale follow-up dovrà essere sottoposto il paziente, e identificare, qualora ci siano, dei carcinomi iniziali.

Per quanto riguarda il **pezzo operatorio**, ne riparlamo dopo.

LE LESIONI PRE-NEOPLASTICHE: GLI ADENOMI POLIPOIDI

La displasia è un'alterazione dell'architettura tissutale, cellulare e nucleare; è una lesione neoplastica in sé, però non è invasiva. È una lesione preneoplastica perché si è visto che se lo lasciamo lì, questi poi portano a cancro in una certa percentuale di casi.

Qual'è la sequenza? Ci sono delle alterazioni ormai ben codificate dagli anni 80 che, dall'iniziale mutazione dell'APC, con conseguenti alterazioni genetiche, si ha la sequenza adenoma-carcinoma (che tutti avete già studiato): cioè si passa da una fase iniziale di alterazione displastica di basso grado a una di alto grado e poi a carcinoma.

La maggior parte dei polipi che noi trattiamo sono gli adenomi, che possono essere di tre tipi:

adenomi tubulari

adenomi villosi

adenomi tubulo-villosi

Questi sono localizzati prevalentemente al colon di sinistra e sono quelli che poi vengono asportati endoscopicamente. A livello macroscopico possono essere **peduncolati** (hanno un peduncolo e una testa moriforme), **sessili**, o in alcuni casi, l'endoscopista vede una lesione irregolare, oppure vede una mucosa granulosa e questi sono gli **adenomi piatti**.

[Slide 18] Dal punto di vista architetturale, gli adenomi possono essere:

- tubulari, cioè costituiti da ghiandole tubulari (nell'immagine: ci sono zone con mucosa normale e l'adenoma con displasia tubulare di basso grado; è appena percettibile la differenza tra le due zone);

- possono essere villosi, con un aspetto con dei villi;
- tubulo-villosi in un contesto in cui c'è una componente tubulare e una villosa.

Il grado di displasia è l'altra cosa che andiamo a valutare, quanto questo nucleo è alterato, cioè tanto più il nucleo o la ghiandola si discostano dal normale, tanto è alto il grado di displasia. Questo è anche importante il fattore prognostico. Se la displasia è di basso grado, avremo dei nuclei bastoncellari che tendenzialmente rimarranno entro la metà della cellula (come in questo caso). In una displasia di alto grado abbiamo dei nuclei che diventano rotondeggianti, grandi, ipercromici.

Queste caratteristiche elencate hanno un significato prognostico. Va segnalata la dimensione, perchè tanto più grande è la lesione, tanto è probabile che quella lesione o che nel colon del paziente ci sia una lesione più aggressiva e che il paziente sviluppi cancro. Nella componente villosa la progressione a carcinoma è nel 17% dei casi. È importante dare l'informazione che il polipo è villosa. Il grado di displasia è molto importante, perchè quando c'è displasia di alto grado abbiamo il 37% di possibilità di sviluppo poi di un carcinoma.

Queste caratteristiche servono per determinare il follow-up del paziente: per i pazienti con uno o due adenomi, piccoli sotto il cm, dove non c'è una componente villosa o una displasia di alto grado sarà ogni 5-6 anni. Poi quali sono gli adenomi ad alto rischio? Quelli in cui noi dobbiamo controllare in maniera più stretta i pazienti: quando ce ne sono più di 3, quando la resezione non è completa, se ci sono adenomi sopra il cm, se c'è una componente villosa o displastica di alto grado.

ADENOMI PIATTI

Sono molto difficili da diagnosticare e l'endoscopista deve essere molto accurato, deve andare a biopsiare tutte le zone di mucosa granulosa, questo perchè sono poco percettibili, però hanno un comportamento di crescita molto rapida, sono più aggressivi e spesso c'è già una displasia di alto grado. Quindi sono delle lesioni che se non identificate possono portare velocemente a cancro.

CARCINOMA DEL COLON-RETTO

Fattori di rischio per carcinoma.

Fattori di rischio:

- abitudini alimentari;
- fattori genetici

Condizioni a rischio, cioè delle situazioni di rischio per il paziente:

- Presenza di polipi neoplastici (adenomi);
- la presenza di malattie croniche intestinali

Queste sono le condizioni che ci inducono a mantenere sotto stretto controllo il paziente.

L'incidenza del CCR è correlato alla dieta perchè si è visto che i pazienti emigranti che vanno in zone ad alto rischio per alcuni tumori, poi sviluppano anche loro il CCR. Quindi verosimilmente sono legate alle situazioni che ci sono nei Paesi in cui si trasferiscono. È noto che ci sono alimenti nella dieta protettivi come l'alto consumo di fibre e vitamine (frutta, verdura, cereali non raffinati), mentre aumentano il rischio i grassi, la carne, ecc. La dieta è responsabile di più del 60-70% dei carcinomi nei Paesi Occidentali. È difficile dire quale sia il fattore dietetico singolarmente, però un pattern dietetico prudente, ricco di frutta e verdura e povero di carne, cibi grassi e raffinati può essere un fattore protettivo. Poi il problema è che questi elementi agiscono tutti molto lentamente, quindi le manifestazioni le vedremo dopo decenni, però è chiaro che una dieta prudente può prevenire lo sviluppo di cancro.

Come si è visto che il CCR è associato ai geni?

Si sono studiati degli elementi neoplastici di per sé: si sono fatti dei modelli di laboratorio

Un elemento fondamentale per andare a capire i componenti della genetica è stato andare a vedere i tumori ereditari. Questo perchè si è visto che i parenti di primo e secondo grado di pazienti affetti da carcinoma hanno un maggior rischio di sviluppare CCR. Ci sono proprio delle famiglie con elevato rischio ereditario di sviluppare il CCR.

[Slide con le percentuali di CCR ereditario, familiare e sporadico: quello sporadico rimane quello prevalente].

Nei CCR si è visto che la più elevata percentuale è dovuta ai casi sporadici. Fattori genetici: ci sono diverse mutazioni, quelle più comuni sono la FAP (poliposi familiare) e la sindrome non poliposica. La prima è dovuta a mutazione dell' APC e la seconda all'instabilità dei microsattelliti. Queste sono le più conosciute, poi ci sono altre sindromi, ma sono meno frequenti.

Per quanto riguarda la **poliposi adenomatosa familiare** (FAP) è una patologia ereditaria autosomica dominante, di solito si sviluppano dopo la pubertà centinaia o migliaia di polipi nella forma classica, poi ci sono anche le forme attenuate, e se non trattata con la colectomia porta nel 100% dei casi al cancro, di solito prima dei 40-50 anni. Possono sviluppare tumori anche in altre sedi; esiste un test genetico, che i parenti dei pazienti possono effettuare per verificare se anche loro presentano la malattia.

Per quanto riguarda il **CCR ereditario non poliposo** (HNPCC), è un carcinoma a esordio precoce che non ha una poliposi diffusa, dove ho una mutazione in geni di fattori di riparazione del DNA, e i portatori di questa mutazione hanno 50-80% di probabilità di sviluppare il cancro; non è il 100% come nella poliposi familiare, però anche questo è un alto rischio, quindi i parenti vanno comunque studiati.

Per quanto riguarda le malattie infiammatorie croniche intestinali, anche quelle sono un fattore di rischio per sviluppare il CCR. Quali sono i fattori di rischio? Perchè non tutti i pazienti con Rettocolite ulcerosa e Morbo di Chron hanno un aumentato rischio. Che cosa aumenta il rischio? La lunga durata di malattia: pazienti che hanno avuto l'insorgenza della malattia a età molto giovanile dopo un tot (10 anni) hanno un aumentato rischio di sviluppare CCR. Quelli che hanno un ampio coinvolgimento colico, quelli che hanno già una storia di carcinoma coloretale, se poi in corso di Rettocolite ulcerosa si associa Colangite sclerosante primitiva o anche un coinvolgimento dell'ileo da una pancolite (backwash ileitis), queste sono tutte condizioni che aumentano la probabilità di presentare cancro in corso di malattia cronica intestinale. Quali sono i fattori che potrebbero diminuire il rischio? Una proctocolectomia profilattica, però non si può mandare tutti i pazienti con malattia infiammatoria cronica incontro a questo intervento; quindi cosa posso fare? Si deve fare la sorveglianza programmata, visite di controllo con colonscopia ed eventuale chemioprevenzione.

Questi sono esempi di che tipi di displasie si possono avere nella Rettocolite Ulcerosa (slide 38): allora quella parte rossa è la componente malata, perchè il problema che si trova ad affrontare l'endoscopista è: ho un paziente con Rettocolite Ulcerosa che ha delle lesioni adenomatose, come mi comporto? Se il paziente ha avuto insorgenza di malattia attorno ai 30 anni o intorno a 40-50 anni, a 60 anni in quella popolazione generale aumenta il rischio di avere degli adenomi sporadici; come faccio a dire se questo paziente ha un adenoma sporadico o ha un adenoma che è legato alla malattia e il paziente è a rischio di cancro e devo farlo andare a fare una colectomia totale? Primo si può vedere con precisione come è distribuita la displasia: bisogna ricordare che nella rettocolite ulcerosa cronica la displasia può essere su mucosa piatta, quindi quando un endoscopista va a controllare un paziente con Rettocolite Ulcerosa cronica (da più di 10 anni) deve stare molto attento ad andare a biopsiare anche mucosa apparentemente normale, perchè ci può essere una displasia piatta che lui non vede. Secondo si devono togliere e controllare tutte le lesioni: se la lesione adenomatosa è in una zona non malata, è sicuro che quello è un adenoma sporadico perchè lì non c'è mai stata malattia. Non solo, ultimamente si è visto che anche in sede di malattia se la lesione è polipoide e completamente resecabile, è verosimile che sia associabile a una lesione di tipo adenomatoso, però non ci deve essere displasia nel resto del colon.

Si parla poi di DALM, displasia associata a masse che sentirete più avanti: è una lesione adenomatosa ad alto rischio di sviluppo di cancro sia sulla lesione stessa, sia su tutto il colon. Da cosa è caratterizzato? Da una lesione simile al polipo, ma con displasia anche sulla mucosa circostante. Infatti l'endoscopista quando vede lesioni polipoidi in una malattia infiammatoria cronica, non solo biopsia il polipo e lo porta via, ma fa biopsie sulla mucosa circostante per vedere se c'è o no displasia. Anche la presenza di displasia in un'area non proprio vicina alla lesione può essere un fattore che indica che quel paziente è ad alto rischio di sviluppare un cancro, anche se non l'ho ancora visto. Non solo, ma i cancri in malattia infiammatoria cronica sono piatti, sono molto difficili da vedere, quindi questi pazienti vanno monitorati attentamente. Poi come abbiamo detto la displasia può essere di basso o alto grado. La DALM va differenziata con un adenoma incidentale perchè, in caso della presenza di una neoplasia associata a masse in una malattia infiammatoria cronica, in quel caso l'intervento deve essere di proctocolectomia. Il problema è che con la DALM, si può essere al 40% in presenza di cancro metacrono alla presenza di displasia.

Quale altro ruolo ha l'anatomopatologo?

Di identificare i carcinomi iniziali. Di studiare quelle lesioni che riscontriamo sempre più frequentemente grazie allo screening e di valutare quale rischio ha il carcinoma di dare metastasi. Quali sono? E perchè li vanno studiati? Perchè si sta cercando di rimuovere per via endoscopica queste lesioni e di portare sul tavolo operatorio il minor numero di pazienti possibile. Quindi in queste lesioni di adenoma cancerizzato a uno stadio molto iniziale, un T1, quanto è sufficiente la polpectomia? Quand'è che devo chiamare il chirurgo per intervenire? Per la definizione di adenocarcinoma è in corso una grande discussione tra anatomopatologi. Non usate mai per il grande intestino il termine carcinoma in situ. Nel grosso intestino, a differenza di tutto il resto del tratto gastrointestinale, si usa il termine adenocarcinoma solo quando la componente neoplastica supera la muscolaris mucosae ed infila la sottomucosa. Questo è un criterio fondamentale, se voi trovate diagnosi di displasia severa e alterazioni ghiandolari displastiche nel contesto della muscolaris mucosae non stiamo parlando di adenocarcinoma; questo perchè si è visto che l'unica lesione che è in grado di dare metastasi è la lesione che supera la muscolaris mucosae. A oggi, con lo screening arrivano, davvero una ventina di lesioni polipoidi al giorno, ma solo tra i 2,6 e 9,7% di questi sono adenocarcinomi. Ci sono dei fattori che mi permettono di avere una percentuale di probabilità di adenocarcinoma:

tanto è più grande, tanto è più probabile che questa lesione abbia del cancro. E la probabilità è dell'1% se la lesione è di 1 cm, se è 2-3 cm la probabilità sale al 10%, quando è maggiore di 2 cm la probabilità arriva al 50%;

è bassa la probabilità di avere progressione se sono tubulari, ma arriva a 40% se sono villosi e tubulo-villosi sono una via di mezzo.

Il grado di displasia: cresce tanto più è aggressivo, tanto è più probabile che ci sia la presenza adenocarcinomatosa. Quando vediamo delle lesioni adenomatose con displasia ad alto grado, andiamo a fare multiple sezioni sulla lesione perchè è possibile che a una sezione più profonda compaia la componente neoplastica, che infila la sotto mucosa.

Quali sono i parametri fondamentali di metastasi linfonodale e recidiva locale, perchè stiamo parlando di una lesione che è stata rimossa endoscopicamente che approfonda e va in sottomucosa, l'abbiamo tolta tutta o no? Dobbiamo fare controlli periodici per vedere se ci sono metastasi linfonodali, e altro, cosa guardiamo però?

I margini di resezione è importante per capire se tolta tutta la lesione;

Che grado di differenziazione ha;

Quanto cancro c'è in quella lesione, cioè ci sono due ghiandole che arrivano alla sottomucosa o è tutto adenocarcinoma?

Cambia!

È presente invasione vascolare?

È presente tumor budding?

Quanto infila?

Quanto è grande?

Sono tutti parametri che permettono al chirurgo, al gastroenterologo, l'oncologo, di decidere cosa fare.

[Slide 45: Grado di differenziazione] SI vede la muscolaris mucosae e si vede la neoplasia che invade la sottomucosa, ma questa struttura assomiglia ancora alle ghiandole, quindi è una displasia di basso grado. È adenoma cancerizzato, ma di basso grado. In una seconda immagine mostra come invece le ghiandole siano irricognoscibili dicendo che si tratta di displasia di alto grado, e che la lesione se anche infila poco è molto aggressiva.

I margini di resezione: vedete, questa è una lesione pedunculata e si vede che è pulita, quest'altra invece vedete arriva sul margine di resezione. Questo che vedete è l'epitelio che arriva sul margine di resezione. Anche qui in realtà viene dato positivo perchè si è visto con il follow up di questi pazienti che anche se la lesione arriva a 1 mm dal margine di resezione il comportamento è ragionevole alla presenza di margine positivo.

La presenza di invasione vascolare: Se io vedo un adenoma cancerizzato che ha già colonizzato i vasi che possono essere linfatici o ematici, ho una probabilità di metastasi linfonodale e quindi sarà un'indicazione all'intervento.

Il budding tumorale: si è visto che negli ultimi 10 anni già da studi di carcinomi squamosi sul labbro che sul fronte di avanzamento neoplastico comparivano degli elementi neoplastici che si distaccavano dal tumore, che avevano una specie di commistione con gli elementi mesenchimali attorno al tumore, che non erano delle infiltrazioni vascolari, ma che avevano un atteggiamento differente rispetto al resto del cancro. Si è visto che in queste lesioni, che si chiamano anche transizioni epitelio-mesenchimali, era come se a quel punto la presenza di questi bazzi, che sono degli elementi singoli o aggregati che comprendono fino a 5 elementi, si staccano dal tumore e sono un primo indizio di questo tumore che sta acquisendo la capacità di diffondere e di dare metastasi linfonodale.

In un lavoro molto vecchio, di Ueno, del 2002 si era visto, facendo un follow up di 500 cancri del colon retto, che c'erano pazienti che avevano tanti di questi foci di budding avevano un alto rischio di avere già delle metastasi linfonodali, chi ne aveva molto pochi cioè meno di 9 aveva anche degli N0.

Parlando dei livelli di infiltrazione della sottomucosa.: Si parla già dall'85 che Haggitt studiando una serie di adenomi, sia peduncolati, sia sessili (vi ho fatto vedere prima la differenza, che non è fine a se stessa: infatti se pensate al microscopista davanti a questa lesione qui fa molto presto a toglierla e resecarla, quest'altra è più difficile da resecare). Comunque Haggitt aveva visto che progredendo il livello di infiltrazione della testa del polipo nella sottomucosa e verso la tonaca muscolare propria, c'era un progressivo aumento della probabilità di avere metastasi linfonodale, che andava dall'1 al 30%.

Qual è il limite della classificazione di Haggitt (che ancora adesso si usa)?

Che secondo questa classificazione tutti gli adenomi cancerizzati sessili erano al livello 4 ed era quindi necessaria per tutte queste lesioni una resezione intestinale, anche se le lesioni più piccole potevano avere anche una probabilità dell'1% di dare metastasi linfonodale. A quel punto uno poteva andare a valutare anche sulla base delle condizioni fisiche del paziente se era maggiore il rischio di un intervento o se era maggiore il rischio di avere metastasi. Se un paziente ha 1% di probabilità di sviluppare metastasi e magari è cardiopatico evitiamo di andare ad ammazzarlo sotto i ferri.

Successivamente 10 anni dopo Kikuchi, un giapponese, studiando le lesioni sessili aveva visto che c'era un gruppo di lesioni che, seppur sessili, con una minima infiltrazione della sottomucosa, di 200-300 micron, avevano un rischio di metastasi linfonodali maggiore di quello degli adenomi peduncolati, ma sicuramente minore di quello che sarebbe stato secondo Haggitt. Quindi per le lesioni sessili si è introdotto la classificazione di Kikuchi.

Qual è il limite di questa classificazione?

Che per dire che un adenoma cancerizzato che arriva vicino alla muscolaris propria devo vederla. Perché se io ho una lesione endoscopica non arrivano mai a togliere tutta la sottomucosa fino alla muscolare propria. Ci sono alcuni tipi di (operazioni?) trans anali che scavano bene, ma di solito non la vedo. Quindi io riesco a fare una diagnosi di SM2 al massimo, non di più.

Immagini [Slide 50]: questa è una a livello 1 e vedete c'è una componente adenocarcinomatosa all'inizio della testa del polipo; questa infiltra un po di più, a un livello 2 di Haggitt; questa è un'immagine da un pezzo operatorio di un adenoma cancerizzato, vedete che infiltra pochissimo la sottomucosa; e questo qui è un livello 3 che vedete che arriva oltre la tonaca muscolare propria. Tutto questo perché sempre di più c'è la necessità, soprattutto adesso con lo screening, di dare una risposta a questi pazienti e agli endoscopisti di quali lesioni devo andare a operare e quali no, quali sono gli adenomi cancerizzati a basso rischio e ad alto rischio.

E quali sono tutti i parametri che servono per dividere le 2 categorie?

- il grado di differenziazione è basso
- il margine di resezione è indenne
- non c'è invasione vascolare
- il budding di invasione tumorale è basso
- se i livelli di Haggitt arrivano al 3
- siamo in un adenoma sessile SM1 di Kikuchi o al Massimo SM2 (basso rischio)

[Se questi parametri sono rispettati] si può prendere in considerazione l'ipotesi, valutando le condizioni del paziente, di non portarlo a intervento.

Ma nel 2004 sempre Ueno, valutando sia pezzi biotici, sia pezzi operatori ha visto una cosa molto importante, è andato a fare una microstadiazione e dice:

tra i polipi che io ho visto e identificato a basso rischio, voglio trovare quelli che sono a rischio quasi 0, quindi dove io posso dire al paziente di stare tranquillo, che hai un adenoma cancerizzato, ma che non serve portarlo all'intervento perché il rischio di metastasi linfonodale è pari a 0. Per fare questo è andato a fare una misurazione microscopica di quanto è ampia e di quanto è profonda la componente adenocarcinomatosa (e vi assicuro che su piccole lesioni un'operazione di questo tipo non è così facile !!!) e si è visto che la situazione cambia radicalmente perché se è al di sotto di 4 mm di larghezza e di 2 mm di spessore il rischio di metastasi linfonodale è quasi pari allo 0! Quindi a un paziente che presenta le condizioni citate prima e un polipo di queste dimensioni posso dire stai tranquillo, tu sei guarito.

Domanda: quante sezioni devono essere osservate per fare una stima di questo?

Si va un po' a dimensioni del polipo. Minimo 3 a diversi livelli dal mio vetrino. Quando arriva un adenoma cancerizzato è di dimensioni minori al centimetro. Quindi sezioniamo il polipo facendo delle fette di 1-2mm e le mettiamo in più blocchetti, poi da queste facciamo varie sezioni e vari livelli. Ovviamente vado a valutare su quello che c'è. Io non posso sapere già che è un adenoma cancerizzato, perché vi assicuro che sono lesioni talmente piccole che ad occhio nudo non si vedono. Però quando la vedo sul vetrino io faccio affondare a affondo finché non sono convinta. E come faccio? Se io vedo che da una sezione all'altra sta aumentando allora vado avanti finché non sono convinta che si sia fermato e ho visto tutto. Ovvio che tanto meno è infiltrante e

tanto più ci avviciniamo a questo, tante più sezioni devo fare perché devo essere sicura di poter dire di non operare perché altrimenti il danno a quel punto sarebbe bello grosso. Paradossalmente per noi patologi la diagnosi di una lesione avanzata piena di metastasi linfatica è facile, il problema sono le lesioni dove devo dire "puoi non intervenire". Vi capiterà se lavorerete in endoscopia o come medici di base di dover tranquillizzare il paziente che si presenta con una diagnosi lunghissima. Allora c'è il dottor Bisio che si occupa di polipi da tantissimi anni, che è un punto di riferimento italiano, che addirittura fa un commento alla fine, dice che sulla base di tutti questi parametri, quelli che abbiamo detto fino ad adesso (peduncolato, sessile, dimensioni, quantità di adenocarcinoma, differenziazione, budding, tutte queste cose qui che vengono messe insieme), commenta "si ritiene che la lesione sia ad alto rischio o non lo sia, oppure si considera un alto rischio di recidiva locale o un alto rischio di recidiva metastatica linfonodale". Per esempio, la presenza di invasioni vascolari ematiche non è solo un rischio di malattia metastatica linfonodale ma anche di una malattia metastatica a distanza, quindi che va anche ad alterare la sopravvivenza del paziente. Ecco perché tutti questi parametri sono importanti e adesso, probabilmente i giapponesi lo staranno già facendo, si aggiungeranno degli altri parametri nel corso degli anni. Negli ultimi 4 anni siamo arrivati ad avere questa pagina intera di parametri e ora, identificando lesioni sempre più precoci, avremo sempre più informazioni da dare.

CARCINOMA COLON RETTALE

Ha delle manifestazioni cliniche diverse a seconda della sede. Quelli a più alto rischio di solito sono i carcinomi di destra che sono silenziosi e che possono dare delle masse esofitiche, mentre quelli del trasverso e del colon sinistro danno delle lesioni stenotiche e quindi danno rapidamente segno di sé.

Mostra delle immagini: colon di destra, con appendice vermiforme, il cieco, una lesione vegetante; questo è un sigma, questa una lesione ad anello; questo è un retto con una lesione polipoide.

Ci sono varie vie molecolari di carcinoma quindi abbiamo

-la FAP e il carcinoma sporadico dovute a una serie di mutazioni che partono dall'APC, però come frequenza il carcinoma sporadico rappresenta l'80% del carcinoma colon rettale, mentre la FAP rappresenta solo 1%;

-la sindrome di Lynch rappresenta il 2%;

-il carcinoma sporadico con instabilità dei micro satelliti non ereditario che rappresenta il 15%.

Poi vi dirò perché è importante identificare gli adenomi con instabilità sporadici.

Questa è un'immagine che vi fa vedere a seconda del tipo di lesione, l'età, quindi abbiamo:

-FAP: soggetti di giovane età

-non polipoidi colorectal cancer: già un po' più avanti ma comunque giovani

-cancro sporadico: pazienti più vecchi.

(Immagini: FAP: Colon tempestato di polipi. NHPCC con lesione ulcerata. Cancro sporadico.)

Cosa fa il patologo quando arriva un pezzo operatorio:

-Deve confermare la presenza del cancro. Quindi sezioniamo il colon, questa è una lesione rilevata che ha un aspetto colloide e questo è l'esame istologico di quello che avete visto: qui c'è la componente adenomatosa affianco e questo è il cancro che infiltra fino al grasso.

-Deve dire quali sono i fattori prognostici. Il fattore prognostico principale è il livello di progressione della lesione quando io opero. Quindi quanto la lesione infiltra, le metastasi linfonodali, i margini, l'istotipo. Quindi devo vedere quanto infiltra la mucosa, la sottomucosa, la muscolare, il grasso, quanti sono i linfonodi metastatici, se ci sono o meno metastasi a distanza e come sono i margini di resezione quindi vedo se l'intervento è stato completamente radicale o se c'è una componente microscopica (R1) o macroscopica di residuo di malattia.

-I linfonodi: sono un elemento di notevole importanza, sono difficili da cercare, ci vuole sia un'attenzione del chirurgo a fare delle ampie resezioni prendere il ventaglio mesenteriale, prendere tanto tessuto adiposo, perché tanto più di questo tessuto ci manca, tanto più è probabile che lì ci siano dei linfonodi, ma è anche un lavoro accurato e noioso per il patologo cercare i linfonodi nel grasso perché ci vuole pazienza, bisogna trovarli tutti, stare tranquilli e avere l'esperienza necessaria e non stufarsi perché tanti più riuscirò a identificarne, tanto più sarà precisa la mia diagnosi e la mia indicazione prognostica. Quanti? Minimo 12 linfonodi. Se trovate un referto con meno di 12 linfonodi il patologo non è stato accurato o il chirurgo ha fatto una resezione minima. Quando andate a vedere una diagnosi andate a vedere anche quanto colon ha resecato perché se per motivi di salute del paziente hanno tolto una porzione minima [potrebbero non esserci abbastanza linfonodi]; ad esempio in un paziente di 90 anni a cui hanno tolto 7cm di una lesione stenotica, è difficile trovare 30 linfonodi. Bisogna arrivare a 12 perché altrimenti viene considerato un NX, cioè come se i linfonodi non fossero stati cercati. Ovvio è che se ne trovo 7 e sono tutti e 7 metastatici non divento matta a cercarne altri poiché ho già il mio fattore prognostico.

-Per quanto riguarda le lesioni retali c'è un altro parametro da valutare che è il margine di resezione radiale mesorettale. In questa immagine c'è (qui c'è una buona chirurgia mesorettale?) il mesoretto che è il tessuto adiposo non rivestito della parte distale del retto (cioè senza peritoneo), dove è fondamentale andare a vedere se c'è neoplasia e quanto dista la neoplasia da questa zona

perché lesioni che arrivano fino a 1 mm da questo margine hanno lo stesso comportamento di una lesione presente come R1 quindi è considerata una malattia non completamente resecata.

-Un altro compito del patologo è indicare al chirurgo quanto è stato radicale nel resecare la lesione dal mesoretto perché vedete, questo è il liscio. Alcune volte vi arrivano delle sezioni trasversali tutte frastagliate perché ci vuole una notevole competenza chirurgica per resecarlo bene e tante volte, se il chirurgo è poco esperto, vi manda dei mesoretti tutti frastagliati. Ovvio è che più è irregolare il margine più è probabile che la neoplasia sia vicina e quindi che sia un R1.

-Gli istotipi: ci sono soltanto istotipi a cellule spesse, che hanno un comportamento più aggressivo, e il carcinoma midollare, che di solito è collegato all'instabilità dei micro satelliti. Abbiamo l'adenocarcinoma classico, il colloide, quello ad anello con castone e il midollare che hanno comportamento differente, l'indifferenziato e quello a piccole cellule. Questa è l'immagine di un mucinoso.

Il budding. Anche in questo lavoro del 2008 si evidenzia che c'è un comportamento differente a seconda dell'entità del budding, cioè tanto maggiore era il budding tanto peggiore era la prognosi del paziente.

-Depositi mesenterici: sono delle localizzazioni nodulari di adenocarcinoma nel tessuto adiposo periviscerale e il quesito che ci si è posti per diversi anni è se queste lesioni fossero dei linfonodi metastatici completamente ostruiti (o sostituiti? Non capisco) o se fossero delle lesioni vascolari, quindi fossero localizzazioni tumorali a distanza dovute a invasione vascolare. Come si fa a distinguerli? In passato si diceva di dividerli in maggiori o minori di 3 mm, poi se erano di forma regolare o irregolare, se lisci era possibile che fossero linfonodi, e c'è stata una serie di dispute. Al momento vanno identificati, numerati, se è possibile bisogna descriverne la forma regolare o irregolare, se i margini sono lisci ad indicare una metastasi linfonodale o irregolari, indicare una verosimile invasione vascolare. Certo è che in caso di un tumore che è N0 per la classificazione TNM questi vengono classificati come N1C. Quindi, sia che si tratti di un linfonodo, sia che sia un'invasione vascolare, questi tumori hanno un comportamento più aggressivo rispetto agli altri e questo è fondamentale.

-Ci sono alcune lesioni che pur essendo allo stadio 2 hanno un rischio maggiore di poter progredire e in questo caso il patologo potrebbe decidere se aggiungere una terapia di supporto, e sono:

T4: con coinvolgimento anche di altre strutture, T4A e T4B;

casi con perforazione intestinale;

casi con segni di ostruzione.

Questi casi sono a più alto rischio, con comportamento più aggressivo e si potrebbe prendere in considerazione una terapia adiuvante dalla quale si è visto che possono trarre giovamento.

-Fattori predittivi: identificare quali pazienti possono giovare di una terapia adiuvante. Quello che è importante sapere è che alcune lesioni che non hanno il pattern classico, che sono quelle legate all'instabilità dei micro satelliti e che il patologo riesce a vedere poiché sono carcinomi diversi, sono pazienti che non rispondono bene al Citofluorouracile e all'Oxadiplatino ma rispondono molto meglio a Irinotecan. Quindi dare l'informazione, questo è un carcinoma midollare e dire che è verosimile che sia dovuto a instabilità dei micro satelliti, può dare un'indicazione su che tipo di terapia fare.

CFR/K-RAS: per i pazienti con terapia metastatica si è visto che la presenza di mutazioni di k-ras è una controindicazione alla terapia mirata contro il cfr. Ecco perché è fondamentale andare a valutare lo stato mutazionale di k-ras qualora vi sia una malattia metastatica, ma lo facciamo solo se l'oncologo ce lo chiede, perché potrebbe essere che l'oncologo decida che il paziente per altri motivi non sia candidabile alla terapia contro il cfr e pertanto noi non la facciamo.

Lezione di Anatomia Patologica del 5/12/2013 (1)

Version:1.0 StartHTML:0000000167 EndHTML:0000065811 StartFragment:0000000454 EndFragment:0000065795

Lezione di Anatomia Patologica del 5-12-2013

Sbobbatore: Simone Ferraro

Revisore: Angela Serafin

Lezioni di Patologia Gastrica

Dottor Giuseppe Zamboni

OBIETTIVI

1 Descrivere i quadri patologici Helicobacter pylori.

2 Definire le condizioni e le lesioni a rischio per lo sviluppo del carcinoma, del linfoma MALT e delle neoplasie umane.

PATOLOGIA GASTRICA NON NEOPLASTICA

In particolare oggi verrà trattata la patologia *Helicobacter pylori* gastrica, prevalentemente cronica. Cercheremo però anche di definire cosa significa condizione a rischio per lo sviluppo del carcinoma (solo in parte). Infine faremo qualche piccolo accenno sulle complicanze dello sviluppo del linfoma gastrico.

A me interesserà solamente richiamare alcune nozioni che sono utili per noi da un punto di vista istologico.

Storia:

La descrizione che nello stomaco potessero esserci degli elementi di tipo Spirochete risale ancora al 1900.

Il primo fu Bizzozzero, giovane studente di medicina di Brescia; fu il primo a descriverli nello stomaco. Aveva solo 19 anni. Poi nessuno più per moltissimi anni ha descritto la presenza di batteri.

Nel 1950 fu fatto uno studio biotico su 1000 pazienti che però non evidenziò nessun batterio.

Solo nel 1983 Warren e Marshall caratterizzarono l'*Helicobacter Pylori* nello stomaco e questo ha portato a una rivoluzione importante e alla comprensione della patogenesi gastrica.

Nel 1994 poi la WHO ha classificato il batterio (*Helicobacter Pylori*) come carcinogeno di prima classe; è stata la prima volta in cui, nella storia della Medicina, un batterio è stato considerato un carcinogeno a tutti gli effetti.

Tutto questo insieme di conoscenze portarono nel 2005 all'assegnazione del Nobel a Warren e Marshall. Warren bevette un brodo di *Helicobacter Pylori* e riuscì, rispettando quelli che erano i postulati di Koch, a dimostrare che il batterio era effettivamente in causa per la patogenesi della patologia gastrica.

L'*Helicobacter Pylori* è stato poi caratterizzato dal punto di vista molecolare in maniera completa, è stato sequenziato in maniera completa. Elementi fondamentali che fanno in modo che questo batterio sia patogeno sono la presenza di flagelli, si riesce a muovere, è caratterizzato da enzimi, tossine con effetto direttamente tossico sull'epitelio e grazie alle adesine riesce ad aderire. Aderisce in maniera specifica all'epitelio gastrico superficiale; è proprio questo l'elemento principale altrimenti senza adesione (pur essendo un patogeno) non causerebbe malattia.

L'ureasi ne consente la sopravvivenza a pH1-pH2.

Sebbene l'*Helicobacter Pylori* cerchi di sopravvivere a spese o comunque portando disagio nello stomaco del paziente, la fisiologia umana dello stomaco e la risposta immunitaria che noi abbiamo sviluppato come organismo sono co-evoluti come la presenza dell'*Helicobacter Pylori* nello stomaco. Siccome questo dura da decine di migliaia di anni e noi tutti uomini siamo evoluti con questo batterio nello stomaco, questa co-esistenza si è evoluta nel tempo; ora c'è la possibilità di rompere questa coesistenza o per motivi igienico-sanitari o per motivi medici. Stiamo rompendo una coabitazione che dura da migliaia di anni. Il batterio come detto è stato clonato completamente. Le aree tossiche sono state caratterizzate in maniera splendida ma ciò che è più sorprendente è che questo batterio è stato sì caratterizzato ma per ogni area geografica del mondo sono state trovate delle mutazioni nel suo genoma; ogni area ha il suo *Helicobacter* e quindi noi potremmo cercare di capire la migrazione delle persone grazie allo studio delle mutazioni.

Se noi rompiamo questo equilibrio tra ospite e batterio e, andando progressivamente a portar via l'*Helicobacter*, potremmo fare del bene riducendo l'aspetto patogenetico in alcuni ambiti; ma dall'altro lato cambierebbero altri equilibri e, infatti, nelle popolazioni normalmente poco colpite da *Helicobacter Pylori* si assiste a un aumento dell'esofagite da reflusso, aumenta l'incidenza del carcinoma esofageo, aumenta l'obesità, aumenta l'incidenza di Diabete di tipo 2 e anche in parte le cosiddette situazioni allergiche.

Sapete bene che la nostra epoca è caratterizzata sempre di più dall'emergenza di un numero stratosferico di allergie. Tutti i bambini crescendo sviluppano una serie di allergie, con svariate cause; una delle possibilità risiede nel fatto che se il nostro sistema immunitario non viene "impegnato" con delle infezioni classiche, probabilmente si va a cercare qualcosa da fare. Quando si tratta di eradicare un'infezione batterica che è

persistita nell'uomo da migliaia di anni, bisogna comunque sempre chiedersi se ne vale la pena e se sono più i vantaggi o gli svantaggi. Iniziano infatti ad esserci degli scettici, bisogna essere consapevoli che si rompe un equilibrio.

E' opportuno quindi avere una certa attenzione di tipo biologico, scientifico o se volete filosofico sull'atteggiamento di eradicare il più possibile queste infezioni.

Noi patologi abbiamo un ruolo nella patologia *Helicobacter* correlata, un ruolo piccolissimo nella diagnosi di infezione; una volta eravamo chiamati a fare diagnosi di infezione sulle biopsie gastriche ma voi nel vostro corso di studio capirete che è molto più utile però cercare infezioni da *Helicobacter* con metodiche non invasive (no endoscopia, no biopsia gastrica, ma uso test del respiro o esame delle feci). Certo è che quando noi patologi abbiamo delle biopsie lo possiamo individuare; biopsia singola ma molto spesso multipla va processata e si ricava un esame istologico.

Per decine di anni tutti i patologi hanno visto queste immagini e non le hanno mai interpretate in maniera corretta perché si partiva dal presupposto che nello stomaco non può vivere alcun batterio, fino a quando qualcuno non l'ha dimostrato.

Oggi **Ematossilina-Eosina** è la colorazione standard più utilizzata e tutti riescono a vedere l'*Helicobacter*. Al microscopio l'*Helicobacter* si trova nello strato, nel film di muco sopra all'epitelio foveolare gastrico, una sorta di dentiera nella quale le cellule sono ben visibili. Qui il batterio sopravvive. Abbiamo però delle colorazioni più efficaci (Giemsa, impregnazione argentea e metodica immunologica con anticorpi che riconoscono antigeni specifici).

Partiamo però sempre dall'assunto che se c'è un batterio con questo aspetto all'ematossilina-eosina, che vive in ambiente acido, può solo essere *Helicobacter*. Si può trovare anche raramente ***Helicobacter Heilmannii*** (1-2% delle infezioni); l'infezione

avviene per via domestica (dall'animale domestico all'uomo e provoca la stessa patologia gastrica). L'*Helicobacter pylori* è due, tre volte più lungo del Pylori, ha forma di cavaturacciolo.

Helicobacter ha un tropismo selettivo solo per l'**epitelio foveolare gastrico**; questo epitelio rappresenta la parte più superficiale della mucosa gastrica, produce un muco neutro colorato con il Pas di rosso. Solo qui si può attaccare il batterio grazie alle sue adesine che legano in modo specifico quell'epitelio. Nel momento in cui non riconosce questo specifico epitelio, non avviene l'adesione (per esempio in bocca). L'epitelio gastrico è presente nello stomaco, nella giunzione gastro-esofagea e nella giunzione stomaco-duodeno (qui condizione di solito metaplastica). La porzione duodenale si tramuta in gastrica perché l'epitelio riesce così a sopportare l'acidità. Però il prezzo da pagare è che si può infettare con *Helicobacter Pylori* e ci possono essere le basi per uno sviluppo di un'ulcera del duodeno.

Quindi l'*Helicobacter* si può ritrovare anche in sedi extra gastriche a patto che ci sia l'epitelio foveolare gastrico.

In questa immagine le cellule blu sono cellule calciformi mucipare, tipiche dell'intestino, più cellule assorbenti; questa è una mucosa gastrica che è andata incontro a una metaplasia intestinale. Questa è una foveola che originariamente era tutta gastrica poi è diventata in parte intestinale.

Alla prima cellula intestinale che si trova, l'*Helicobacter* non si attacca più perché mancano appunto le adesine, quindi se volete anche la metaplasia intestinale dello stomaco potrebbe essere interpretata come un modo per sfuggire o per rispondere alla presenza dell'*Helicobacter*. Infatti uno stomaco che si trasforma in maniera trofica e abbia molta metaplasia intestinale non presenta più l'*Helicobacter*.

L'epitelio è diventato metaplastico intestinale e quindi ha funzione assorbente.

Uno stomaco fisiologico assorbe solo alcool.

L'epitelio intestinale nello stomaco assorbe sostanze che non è detto facciano bene in quella sede. Ci sono quindi aspetti sia positivi che negativi di questa trasformazione.

Se la metaplasia non è troppo estesa probabilmente ci si convive se non siamo predisposti a qualcosa di pericoloso.

Noi dobbiamo stabilire però se l'*Helicobacter* ha causato o meno un danno allo stomaco, l'obiettivo è capire che tipo di danno ha dato nel singolo stomaco del paziente.

Esistono infatti batteri **citotossici** o **non citotossici**. Quelli citotossici sono correlati alla patologia. Nel caso della patologia dello stomaco abbiamo gastrite, ulcera, cancro; noi sappiamo che c'è un rapporto tra tipo di tossicità legata all'*Helicobacter* e sviluppo di malattia.

Quando voi andate a vedere le biopsie gastriche di un singolo paziente mettete insieme tutto: le predisposizioni genetiche, alimentari, di infezione e il tutto si somma con il danno visibile.

A noi non interessa il danno in una micro-area ma nella totalità dello stomaco.

Lo stomaco funzionalmente è diviso in aree che cooperano e che sono diverse: l'**antro** produce la Gastrina, il **corpo fondo** produce la Pepsina. Sono due aree diverse e quindi quando definiamo la Gastrite, la definiamo con un termine generico; bisogna capire quali sono le aree colpite nel paziente, perché non tutte le gastriti sono uguali, non tutte porteranno al cancro.

Parlare di gastrite da *Helicobacter* è troppo generico.

DIAGNOSI DEL DANNO NELLO STOMACO

Sono necessarie le **biopsie**.

L'endoscopista descrive ma la gastrite è una patologia piuttosto capricciosa.

Possiamo avere un reperto clinico (dolori, bruciore e quant'altro) e uno macroscopico ma non c'è sempre correlazione tra questi due aspetti. Infatti sintomi dolorifici non sempre corrispondono a un esame macroscopico rilevante.

Viceversa se si vede uno stomaco macroscopicamente "messo male" il paziente potrebbe non riferire dolore o bruciore. Inoltre l'aspetto macroscopico non è perfettamente sovrapponibile all'aspetto microscopico-istologico.

La classificazione si fa su base microscopica.

Possiamo avere uno stomaco apparentemente normale che è istologicamente patologico.

Un esempio su tutti: se noi prendiamo una biopsia nel corpo fondo ci aspettiamo una mucosa corpo-fundica. Se in questa sede noi trovassimo una mucosa che è di tipo antrale, perfettamente organizzata, potremmo definirlo come stomaco patologico. La singola biopsia non è patologica e se l'endoscopista non mi dice che è stata presa nel corpo fondo noi la definiamo come mucosa gastrica antrale normale: è patologica perché l'abbiamo incrociata, trovata in una sede non appropriata.

Ecco quindi che una mucosa anche macroscopicamente normale diventa patologica quando non c'è corrispondenza tra sede e tipo di mucosa.

Le biopsie vanno separate: in un bocchetto si mettono le biopsie che derivano dall'antro, in un bocchetto si mettono quelle che derivano dal fondo per distinguerle in maniera chiara.

Un'area che viene campionata separatamente è la **piccola curva gastrica**. Il motivo principale di questo risiede nel fatto che questa sede è una spia di quello che potrebbe succedere in quello stomaco.

La patologia di solito è un equilibrio che si è rotto. Un equilibrio che si è rotto tra fattori protettivi e fattori aggressivi.

Se voi avete un'infezione da *Helicobacter* non tutte le parti dello stomaco reagiscono ugualmente. La piccola curva gastrica è quell'area in cui c'è un solo plesso vascolare sottomucoso invece di un intreccio di vasi. E' presente una sola arteria che irrorava e c'è una vascolarizzazione ridotta. Noi sappiamo che la vascolarizzazione è l'elemento protettivo maggiore: porta fattori nutritivi... Quindi questa è una zona che a parità di danno, a parità di effetto tossico, risponde meno o si ammala di più; Ci può dare quindi

un segnale più evidente di quello che può succedere in quello stomaco. È proprio questa la sede dove più frequentemente si sviluppa il carcinoma.

Nello stomaco l'epitelio foveolare è comune, uguale, ma nell'antro abbiamo cellule mucipare che secernono muco e cellule che producono gastrina. Nel corpo abbiamo cellule parietali che producono acido e fattore intrinseco e cellule principali che producono pepsinogeno.

Le cellule che producono gastrina sono le uniche cellule endocrine che hanno due poli.

La cellula endocrina di solito è descritta come cellula chiusa, ha dei granuli e immette il suo secreto nei vasi.

Le **cellule G dello stomaco**, invece, hanno propaggini che giungono fino al lume della ghiandola; questo è necessario perché a livello della superficie esterna queste cellule devono apprezzare quanto acido c'è, se c'è del cibo nello stomaco. Quindi in base a questi sensori che hanno in superficie, rispondono di conseguenza immettendo gastrina nel sangue e modificando il livello di gastrinemia. Le funzioni della gastrina nello stomaco sono correlate in maniera modulata a controllare la secrezione acida (cellule parietali per l'introduzione dell'acido), a controllare le cellule principali e a controllare le cellule endocrine del Sistema Neuro Endocrino Diffuso. Quanta più gastrina c'è tanto più queste cellule producono, si dividono e diventano iperplastiche. La gastrina in particolare controlla la rigenerazione dell'epitelio; più gastrina abbiamo più il nostro epitelio gastrico ha lo stimolo a rigenerare e a produrre.

Ogni volta che una cellula si divide abbiamo un piccolo rischio: si può dividere male, si può dividere in maniera non congrua.

Quindi la proliferazione cellulare è correlata con il rischio di trasformazione neoplastica. Se questo avviene per anni può essere un problema: il livello di gastrina è fondamentale per la fisiologia dello stomaco, per il rinnovamento epiteliale, per la produzione di acido e per il controllo della proliferazione delle cellule endocrine.

Nella parte finale della foveola prima che diventi ghiandola abbiamo la rigenerazione delle cellule. A questo punto ci possono essere due destini: se decide di diventare cellula foveolare prosegue in alto, se decide di andare a ricostituire le ghiandole proprie si dirige in basso.

SEMEIOTICA ISTOPATOLOGICA

Quali sono le lesioni che noi vogliamo andare a vedere al microscopio?

Le lesioni elementari sono l'**edema** e l'**iperemia** che caratterizzano la fase acuta della flogosi.

Poi abbiamo una **componente cellulare**, dobbiamo capire se ci sono polimorfonucleati, se sono monociti linfociti macrofagi, se ci sono aggregati linfoidi magari con follicoli linfoidi (lo stomaco non ha aggregati linfoidi), oppure se ci sono degli eosinofili, segno di meccanismo allergico.

Oppure andiamo a valutare l'epitelio, che può essere normale o può essere degenerato.

L'epitelio infatti si può erodere (erosione come perdita superficiale di epitelio), oppure può rigenerare (iperplasia). Se rigenera, può rigenerare in maniera congrua oppure dare origine a una metaplasia (cambiamento fenotipico dell'epitelio).

La **metaplasia** dello stomaco può essere di due tipi:

- **Pseudopilorica**, le mucosa è come se fosse pilorica, antrale, ma è fundica (può avvenire solo nel corpo e nel fondo).

- **Intestinale** (può avvenire sia nell'antro sia nel fondo), la più importante.

Da un punto di vista di funzione, se viene sostituita una cellula che produce acido con una cellula che produce muco, funzionalmente c'è una bella differenza.

Abbiamo poi l'**Atrofia**, mancanza di ghiandole e quant'altro, o perché mancano o perché sono state sostituite da altre ghiandole non proprie. Noi vediamo quindi una mucosa normale che però è atrofica se viene trovata nel fondo (questo lo sappiamo solo grazie alla correlazione topografica). Può esserci iperplasia delle cellule endocrine oppure iperplasia delle cellule parietali (cellule a forma di fiamma; nei pazienti in trattamento con farmaci inibitori di pompa queste cellule si gonfiano e degenerano).

Tutti questi sono aspetti di semeiotica da vedere sulle biopsie.

Mettendo insieme queste lesioni elementari con la sede di prelievo dovremmo riuscire a comporre una diagnosi del nostro paziente, perché quello che è chiaro è che l'*Helicobacter Pylori* nelle malattie gastriche produce diversi quadri patologici, non c'è un effetto unico.

L'*Helicobacter*, dopo un periodo di infezione (che può durare giorni o settimane e in molti casi può essere inapparente), e dopo aver "sconfitto" il nostro sistema immunitario, stabilisce un certo equilibrio e si sviluppa una **gastrite cronica superficiale**; cronica perché compaiono i linfociti, ma comunque superficiale, non colpendo la porzione ghiandolare profonda e senza incidere in maniera determinante sul funzionamento di quello stomaco.

Nella maggior parte dei pazienti infettati da *Helicobacter Pylori* questo rimane per decine di anni o addirittura per sempre.

Questa situazione può rimanere per sempre e ha pochissimo rilievo patologico, sull'effetto fisiologico dello stomaco e sulla possibilità di formare cancro.

La maggior parte dei pazienti colpiti da infezione di *Helicobacter*, sviluppa gastrite cronica che probabilmente rimarrà tale e senza alcuna implicazione nella trasformazione neoplastica.

Qualcuno di questi pazienti svilupperà **malattia peptica**, con sviluppo di ulcere soprattutto nel duodeno. Qualcun altro invece, in seguito alla persistenza dell'*Helicobacter*, passerà da una gastrite cronica superficiale a una **gastrite cronica trofica**: la flogosi si approfonda e va a incidere sulla componente ghiandolare dello stomaco, riducendola. Questa è una situazione già più complicata sia da un punto di vista fisiologico sia da un punto di vista delle complicanze possibili verso la trasformazione neoplastica.

Poi ci sono dei pazienti che sviluppano una grande risposta immunitaria linfocitica (**iperplasia linfatica**). Lo stomaco è privo di follicoli linfatici e se compaiono significa che è presente l'*Helicobacter*. Questi sono pazienti che, in una piccola percentuale potrebbero sviluppare un linfoma gastrico.

Gli aspetti quindi legati all'infezione e alla risposta dello stomaco sono svariati.

Bisogna capire quale gastrite è presente e quale esito può avere il nostro paziente.

Da che cosa dipende questo ventaglio così eterogeneo di malattie?

Dipende dal ceppo batterico, dipende dall'ospite, dipende da co-fattori ambientali. Probabilmente c'è correlazione anche con il fumo e con sostanze ossidanti presenti nella carne grigliata. Dipende anche dall'età di infezione.

Messi insieme tutti questi fattori, possiamo ottenere la probabilità di sviluppare una patologia.

Qualcosa dipende anche dall'*Helicobacter*, caratteristiche antigeniche, da quanto si muove, da quanto produca proteine vacuolizzanti.

Tenete presente che se l'*Helicobacter* è stato con noi decine e decine di migliaia di anni, vuol dire che nella maggior parte dei casi abbiamo convissuto; "decidiamo" che lo guardiamo ma non troppo, nel senso che non attuiamo una risposta immunitaria eccessiva.

Partiamo dal concetto che non lo possiamo distruggere; se lo attacchiamo troppo con il nostro sistema immunitario non ne veniamo a capo e rischiamo di perdere le nostre cellule epiteliali.

La coesistenza è possibile solo se il nostro sistema immunitario lo tiene lì con piccole infiammazioni e se l'*Helicobacter* in questione non è eccessivamente "cattivo".

Nella maggior parte dei casi avremo quindi una **flogosi cronica superficiale**.

Finché la flogosi si attesta nella porzione superficiale, la componente ghiandolare non è interessata. Possiamo convivere a lungo.

Da un punto di vista di secrezione acida, possiamo distinguere soggetti ipersecernenti e soggetti iposecarnenti. A parità di qualsiasi altro fattore immunologico, batterico, quelli che hanno una grande produzione di acido di solito hanno una gastrite che si localizza nell'antro e questa gastrite antrale si associa di solito all'ulcera duodenale.

Coloro invece che sono iposecarnenti saranno caratterizzati da una gastrite a livello di corpo e fondo; prevalentemente svilupperanno ulcera gastrica e saranno maggiormente predisposti allo sviluppo di carcinoma gastrico.

MALATTIA PEPTICA

La malattia peptica cos'è? La malattia peptica di fatto è una gastrite che si localizza prevalentemente nell'antro; una gastrite antrale. Però nella maggior parte dei casi questa si complica associata a un'**ulcera nel duodeno**. L'ulcera del duodeno quindi trae la sua patogenesi da una infezione di *Helicobacter* che si localizza prevalentemente nell'antro; non esiste ulcera duodenale senza iperproduzione di acido.

Una volta valeva questo caposaldo: no acid no ulcer. L'acido ci deve essere per forza per causare l'ulcera duodenale; ora noi sappiamo da dove arriva questa iperproduzione. Questa iperproduzione non nasce nel duodeno bensì nell'antro.

E perché c'è iperproduzione di acido in una gastrite antrale?

L'*Helicobacter* sopravvive nello stomaco perché, grazie all'ureasi, è protetto da una nuvola di ammoniaca basica e quindi non è sottoposto direttamente all'acido gastrico e si protegge.

Le cellule G dell'antro sono fatte per andare a testare, a campionare se c'è acido o no in quello stomaco. Sulla superficie di questa mucosa questi sensori della cellula G, in presenza di *Helicobacter* e di gastrite cronica antrale che ambiente percepiscono?

Percepiranno un ambiente alcalino e producono quindi una quantità di gastrina maggiore.

Questa ovviamente farà produrre più acido da parte delle cellule parietali in una quantità molto maggiore rispetto al normale feedback. Questo acido in quantità esorbitanti passa con il bolo gastrico in duodeno; qui trova un epitelio duodenale che resiste all'acido, ma solo in condizioni normali. Se le quantità sono eccessive l'epitelio duodenale andrà incontro a morte e risponderà rigenerando per poi dare metaplasia gastrica.

Il bolo alimentare acido che passa quindi in quella zona metaplasica gastrica cosa fa (portandosi dietro l'*Helicobacter* dallo stomaco)? Rilascerà l'*Helicobacter* anche su quell'isola di epitelio gastrico e quindi l'insieme dell'acido e dell'*Helicobacter* porteranno alla formazione di un buco nella prima porzione duodenale.

Una volta era causa di morte perché l'ulcera poteva essere perforante, c'erano delle emorragie; l'ulcera poteva essere a cielo coperto o scoperto. Coperto nel caso in cui il pancreas o l'omento si metteva sopra. A cielo libero invece era visibile nel peritoneo tutta la quantità di acido e i pazienti morivano per emorragie.

Da sempre i medici hanno curato questa patologia portando via l'acido e ottenendo così la cicatrizzazione dell'ulcera (no acid no ulcer). Ma non è possibile vivere per sempre senza la produzione di acido; quando la terapia terminava, tornava l'ulcera.

Una volta si usava un intervento chirurgico nel quale veniva asportato lo stomaco; una gastro-resezione. In questo modo l'ulcera rimaneva nel paziente ma senza la zona che produceva gastrina.

Oggi è stata sviluppata una terapia medica antibatterica antisecretiva.

Parlando di malattia peptica, è importante considerare l'ulcera duodenale e l'ulcera gastrica: entrambe possono essere espressione di malattia peptica causata dall'acido, ma queste due situazioni hanno caratteristiche molto diverse tra di loro.

(Segue digressione del professore sulla differenza di significato tra eteroplasia e eterotopia.)

Nel duodeno di solito è presente la metaplasia gastrica dell'epitelio superficiale, ma ci può essere un'isola di mucosa gastrica fundica: cioè superficie foveolare e ghiandole fundiche (producono acido; di solito in soggetti ipersecernenti che abbondano in cellule parietali, le quali si spostano dal corpo e arrivano a costituire isole di eterotopia nel duodeno).

Eterotopia letteralmente significa dislocazione di una mucosa o di un epitelio di tipo normale in un'altra zona. Quindi la differenza tra metaplasia gastrica e eterotopia risiede nel fatto che la metaplasia è solo di superficie foveolare, l'eterotopia vuol dire che è completa.

Torniamo alla differenza tra ulcera duodenale e ulcera gastrica.

Tra loro sono completamente diverse. Entrambe sono prodotte dall'acido e dalla presenza di un'area di necrosi.

In generale non si va mai a biopsiare la parte del fondo dell'ulcera perché non possiamo sapere quanto è profonda. C'è il rischio di perforazione; ciò che a noi interessa è capire se un'ulcera è benigna o è maligna.

L'**ulcera duodenale** deriva da una gastrite antrale complicata con un'ulcera del duodeno. Inoltre è completamente priva di potenzialità di trasformarsi in cancro. Il medico esclude subito la diagnosi di carcinoma ulcerato. Sappiamo che non va quindi biopsiata ma diamo per scontato che sia benigna; si cicatrizzerà se portiamo via l'*Helicobacter* e l'acido. No biopsia, sì follow-up endoscopico per verificare il grado di cicatrizzazione.

L'**ulcera gastrica** (nello stomaco) va considerata in prima istanza come potenzialmente neoplastica fino a prova contraria. Cos'è questa prova contraria?

Mi riferisco alle biopsie eseguite sul bordo dell'ulcera che devono essere sufficientemente numerose da campionare buona parte di questa superficie.

Questa ulcera la possiamo considerare benigna solo quando abbiamo biopsie benigne.

Ma ci resta ancora un dubbio: mettiamo il paziente in terapia e dopo facciamo un follow-up, andiamo a vederla e anche quando è cicatrizzata ripetiamo comunque la biopsia. In questo modo recuperiamo circa un 5% di carcinomi gastrici che ci erano sfuggiti al primo esame.

Ma qual è la condizione di base per fare l'ulcera gastrica?

La condizione di base è un tipo di gastrite completamente diversa.

Non sarà una gastrite antrale ma una **gastrite diffusa** (cioè una gastrite atrofica cronica).

Adesso abbiamo capito perché tutti i saggi precedenti avevano chiaro in testa questo concetto: i pazienti con un'ulcera duodenale hanno un'incidenza di sviluppo di carcinoma gastrico inferiore agli altri.

Per un sacco di tempo quindi si è pensato che l'ulcera duodenale proteggesse dallo sviluppo del cancro gastrico.

Questo è valido, ma è la spiegazione che non è valida. Non è l'ulcera duodenale che protegge dal cancro bensì il tipo di gastrite che non coinvolge il corpo fondo.

E' il tipo di gastrite che produce l'ulcera duodenale che "protegge" o comunque non si associa al carcinoma gastrico.

Il paziente quindi non va stressato se ha un'ulcera duodenale, va studiato se ha un'ulcera gastrica.

L'ulcera duodenale non degenera, l'ulcera gastrica può degenerare in cancro. Questa ulcera gastrica non è un'ulcera benigna che poi negli anni diventa maligna; è un'ulcera che è già cancro ed è un cancro che si è ulcerato.

E magari noi questo cancro l'abbiamo anche biopsiato e abbiamo avuto delle biopsie negative.

Va sfatato il concetto che il cancro sia molto più efficace dell'epitelio normale. L'epitelio gastrico è molto più efficace del cancro nel chiudere i buchi e inoltre risponde meglio all'acido. L'acido gastrico in generale possiamo dire che uccide la neoplasia. Noi stiamo in equilibrio con la neoplasia gastrica inizialmente probabilmente per 5-10 anni perché la nostra acidità gastrica lo uccide, lo lima, lo porta via; nel momento in cui l'acidità gastrica è più efficace nell'uccidere le cellule gastriche, si crea un buco. A questo punto ipotizziamo che ci sia epitelio-cancro ed epitelio normale; siamo in competizione, chi riesce a chiudere il buco?

Nel proliferare è più efficace la cellula normale o quella cancerogena?

È più efficace una cellula normale. La cellula del cancro prolifera poi si tocca poi si ferma; è meno efficace ma non la fermi.

Allora diciamo che la cellula normale è più efficace e chiude il buco o comunque cerca di chiuderlo.

Se io vado a biopsiare questa ulcera in una fase particolare del suo stadio trovo una specie a zebra: posso trovare epitelio normale e epitelio neoplastico che competono per chiudere il buco.

Io posso quindi biopsiare un carcinoma ulcerato dello stomaco e avere come risultato delle biopsie normali; ecco perché è necessario che ne faccia tante anche dopo la cicatrizzazione ed ecco perché noi oggi sappiamo che qualsiasi ulcera gastrica che poi si trasforma in cancro, era già cancro, solo che istologicamente c'era una commistione tra epitelio normale e epitelio neoplastico.

Quando esplode il carcinoma gastrico e diventa una malattia drammatica? Quando le cellule neoplastiche non rimangono più in superficie, ma riescono a scappare e a non essere più raggiunte dall'acido, quando cioè riescono a infiltrare la parete muscolare.

Quando la cellula neoplastica, dopo che è stata limata e portata via per anni dall'acido, arriva a interessare la parete muscolare è in una zona franca perché non può più essere raggiunta dall'acido.

A questo punto la sua proliferazione è inesorabile e la neoplasia esplode in pochi mesi. Noi dobbiamo identificare le fasi iniziali di tutto ciò e in maniera corretta.

GASTRITE CRONICA ATROFICA

Questa gastrite è da contrapporre a quella antrale e a quella superficiale.

La condizione di base affinché si sviluppi questa patologia è che ci siano Helicobacter citotossici, che il nostro sistema interagisca in quel modo, che ci possano essere delle modificazioni degenerative dell'epitelio, che si arrivi magari a delle erosioni, che si porti alla metaplasia intestinale.

La metaplasia intestinale è quella che predispone al carcinoma gastrico più frequente nelle aree in cui c'è presenza di grandi infezioni da Helicobacter.

Tenete presente che il nostro organismo è piuttosto singolare. Lo stomaco fa un carcinoma di tipo intestinale; il pancreas fa un carcinoma con un fenotipo gastrico e così via... Evidentemente sono meccanismi diversi. Perché ci interessa la metaplasia intestinale? Perché è un passaggio obbligatorio per formare uno dei due tipi di carcinoma gastrico che è il carcinoma intestinale. Non potremmo spiegarci perché lo stomaco fa un carcinoma intestinale se non attraverso tutta questa sequenza di eventi che portano all'epitelio intestinale. Se guardiamo le casistiche del carcinoma gastrico nelle aree in cui l'infezione da Helicobacter è molto alta, il carcinoma intestinale è quello più frequente.

In Italia oggi il carcinoma intestinale è meno frequente, in proporzione è più frequente quello di tipo gastrico (carcinoma a cellule disperse).

Abbiamo abbassato moltissimo il carcinoma gastrico, ma soprattutto quello correlato allo sviluppo dell'Helicobacter.

La sequenza di eventi è dunque questa: arriva l'Helicobacter; evoca una reazione granulocitaria nel tentativo di distruggerlo; i granulociti nell'epitelio degranulano, ma non ce la fanno, così continuano per anni. Abbiamo poi una suddivisione degli individui in base al tipo di reazione: granulocitaria o linfocitaria-monocitaria. I soggetti con reazione granulocitaria sono quelli a maggior rischio di carcinoma perché producono in sede una quantità di perossidi esorbitante.

Si giunge quindi a una metaplasia intestinale diffusa: è questa la gastrite cronica multifocale diffusa che predispone al carcinoma gastrico.

Per riassumere quindi possiamo dire che il rapporto Helicobacter-gastrite-cancro esiste, ma solo per un certo tipo di patologia e di persona che svilupperà una gastrite cronica multifocale del corpo fondo. Solo questi pazienti saranno a rischio di carcinoma.

Lezione di Anatomia Patologica del 12/12/2013 (1)

Lezione di Anatomia Patologica del 12/12/2013

sbobinatore: Giorgia De Conti

revisionatore: Giulia Salandini

IL CARCINOMA GASTRICO – dott. Kenichi Hirabayashi

La lezione di oggi sarà sul carcinoma gastrico, tenuta dal dottor Kenichi Hirabayashi, della Tokai University, che ha lavorato con noi un paio d'anni in progetti di ricerca sul cancro del pancreas. Illustrerà come viene affrontato e trattato il carcinoma gastrico in Giappone, dove c'è un'incidenza altissima di questo carcinoma, e dove per questo motivo sono stati sviluppati i concetti di carcinoma gastrico, diagnosi, terapie.

La lezione tratterà le differenze geografiche del cancro allo stomaco tra il Giappone e le nazioni europee e nordamericane.

- 1) Incidenza del carcinoma gastrico
- 2) Cause delle differenze geografiche (dieta; fattori genetici; infezione da Helicobacter pylori)
- 3) Screening del carcinoma gastrico in Giappone
- 4) Trattamento del carcinoma gastrico in Giappone (EMR/ESD)
- 5) Differenze nei criteri diagnostici

1) Incidenza del carcinoma gastrico

Il prof mostra una mappa del mondo: le zone in rosso sono le aree con un'alta prevalenza di carcinoma gastrico, e sono le nazioni est-asiatiche, come Giappone, Corea, Cina; al contrario nord America, Europa e Africa mostrano una bassa incidenza del cancro.

In Italia tra gli uomini il carcinoma più comune è quello prostatico, nelle donne quello alla mammella; il carcinoma gastrico è al 5° posto per gli uomini e al 10° per le donne.

In Giappone per gli uomini il carcinoma gastrico è al primo posto, per le donne invece è il tumore alla mammella; il carcinoma gastrico è al 3° posto. Il Giappone è una nazione ad alta incidenza per questo tumore, l'Italia è al 4° posto come incidenza.

Il prof. Zamboni aggiunge che pur essendo l'Italia un paese a bassa incidenza, ci sono delle aree in cui l'incidenza è uguale al Giappone o alla Cina (zona del mantovano, dove l'incidenza è pari al 60-70%, come il Giappone, e la Toscana; probabilmente sono legati all'inquinamento del terreno da parte dell'agricoltura). Questo è da tenere presente quando si ha a che fare con i pazienti con carcinoma gastrico.

Nelle aree ad alta incidenza (Giappone, Cina) Sono più comuni, nelle aree a bassa incidenza ... sono più comuni (12.00-12.35 non ho capito i tipi di cancro).

2) Cause delle differenze geografiche

Per quello che riguarda la dieta, un alto intake di **cibo salato** e **“smoked food”**, come formaggio, sono correlati al rischio di carcinoma gastrico. Ha un ruolo anche il basso intake di frutta e verdura fresche. Inoltre il rischio di carcinoma gastrico aumenta in associazione all'infezione da *Helicobacter Pylori*.

I giapponesi di solito mangiano riso, pesce, tè verde non zuccherato, tutti cibi molto salati. La Cina del nord e il Giappone mostrano un più elevato intake di cibo salato rispetto agli Stati Uniti e alla Gran Bretagna.

L'incidenza del carcinoma gastrico in Giappone è piuttosto elevata, ma sta calando. I motivi sono un cambiamento delle abitudini alimentari, soprattutto nell'intake di sale, e un calo delle infezioni da *Helicobacter Pylori*. Per quello che riguarda la dieta contano l'influenza dei paesi esteri (c'è stato un viraggio da uno stile asiatico a uno più occidentale) e un cambiamento nelle tecniche di conservazione del cibo, dal sale verso il surgelamento.

Slide - consumo di sale giornaliero in Giappone dal 1975 al 2002; nel 1975 si consumavano 13,5 g/die, nel 2002 era 11,4 g/die. La curva è calata negli anni '80 e aumentata nei '90, mostrando un andamento bimodale, ma il prof non ne conosce il motivo reale, probabilmente è legato all'andamento economico del paese.

Slide - relazione fra la dieta e il luogo di nascita dei giapponesi (confrontando quelli nati in Giappone piuttosto che alle Hawaii) e lo sviluppo del carcinoma gastrico. I giapponesi nati in Giappone mostrano una maggiore incidenza del cancro rispetto sia ai caucasici che ai giapponesi nati alle Hawaii, sono cioè più vulnerabili.

Differenze biologiche tra il carcinoma in Giappone e in Gran Bretagna: in Gran Bretagna c'è una maggiore espressione di c-ERB-B2, mentre in Giappone di nm23; il tumore britannico mostra inoltre un indice di proliferazione più elevato rispetto al Giappone. Quindi i dati sembrano indicare che il carcinoma gastrico giapponese sia diverso da quello europeo.

IL RUOLO DI HELICOBACTER PYLORI

Infine conta il ruolo dell'infezione da *Helicobacter Pylori*. E' un batterio gram negativo di forma elicoidale, che infetta la mucosa gastrica, provocando gastrite cronica, ulcere, gastrite atrofica, metaplasia intestinale, disfagia (*non si capisce*).

Mostra una mappa sulla prevalenza dell'infezione da *Helicobacter*: le nazioni sviluppate, come Europa e USA, hanno una prevalenza del 58%, le nazioni in via di sviluppo del 74%; in Giappone la prevalenza è del 71%.

L'infezione avviene per trasmissione interpersonale (via oro-orale o feco-orale); le condizioni igieniche hanno un ruolo nel calare la diffusione.

Slide - situazione igienico-sanitaria in Giappone dal 1965, dove era meno del 20%, al 2006, dove è migliorata notevolmente. Nel 1950 in Giappone la prevalenza di infezioni da *Helicobacter Pylori* era molto elevata, nel 2030, grazie al miglioramento delle condizioni igieniche, ci si aspetta che sia sotto il 40%.

I fattori di virulenza sono svariati: ureasi, endotossine, CAG-A. C'è una differenza geografica anche nella presenza di CAG-A: più del 90% delle forme giapponesi di *Helicobacter* sono CAG-A positive, contro un 30-70% delle forme europee e nordamericane. L'infezione con un batterio CAG-A positivo presenta un maggiore rischio di sviluppare una malattia gastrica rispetto ai ceppi negativi.

Ci sono 2 categorie maggiori di CAG-A: est-asiatica e occidentale. Quello est-asiatico mostra un grado maggiore di infiammazione, gastrite e atrofia. Nelle nazioni occidentali (a bassa incidenza di carcinoma gastrico) ho solo il tipo occidentale di CAG-A, in quelle asiatiche (ad alta incidenza di carcinoma gastrico) ho solo il tipo est-asiatico.

3) Screening del carcinoma gastrico in Giappone

Il Giappone ha un sistema speciale di screening del carcinoma gastrico dal 1983; i soggetti devono avere più di 40 anni e sono controllati una volta l'anno.

Secondo lo studio di Hamashima, basandosi sul costo e i risultati, la miglior tecnica per lo screening è la gastroradiografia.

L'incidenza di carcinoma gastrico in Giappone è del 30-50%, piuttosto alta, mentre in Europa e nord America è del 16-24%.

4) Trattamento del carcinoma gastrico in Giappone

In Giappone normalmente si usano la EMR (endoscopic mucosal resection) e la ESD (endoscopic submucosal dissection) per il carcinoma gastrico, mentre non si usano operazioni chirurgiche. Sono tecniche meno invasive, usate sia per il trattamento che per la diagnosi di carcinoma gastrico.

EMR è usata convenzionalmente per piccole lesioni. Si inietta acqua, dopodiché viene rimossa la lesione. ESD è più complessa, servono 1-2 ore ed è per lesioni più grandi. Si marca attorno al tumore, si inietta acqua sotto la lesione tumorale, si taglia e stacca la mucosa e si rimuove la lesione.

Il prof. Zamboni aggiunge che in futuro queste tecniche si diffonderanno anche in Italia; attualmente sono tecniche molto particolari che si fanno in pochissimi posti, sono molto specialistiche e permettono il risparmio dello stomaco del paziente; richiedono grande abilità dell'esecutore e una buona tecnologia. I giapponesi sono dei pionieri in questo ambito.

Domanda: nelle aree italiane ad alta incidenza di carcinoma ci sono programmi di screening?

Risposta: non c'è un vero programma di screening, però c'è molta più attenzione in quelle aree rispetto alle altre. In Italia i programmi di screening riguardano il pap-test per primo, poi la mammella, il colon (sangue occulto e sigma), forse parte il polmone in alcune aree; lo stomaco no perché l'Italia è una regione a bassa incidenza, i giapponesi invece lo fanno perché da loro è una grande emergenza oncologica.

Dopo la resezione la lesione è sezionata e analizzata al microscopio per fare diagnosi.

5) Differenze nei criteri diagnostici

Il prof. fa degli esempi per sottolineare come uno stesso concetto di partenza possa ricevere diverse interpretazioni, per sottolineare le differenze tra i vari criteri diagnostici.

Mostra l'immagine di una biopsia della papilla maggiore di Vater, con cellule dai nuclei ipercromici e forma irregolare, chiedendo che diagnosi formuleremmo.

In Giappone c'è una classificazione per i tumori del tratto gastrointestinale: esofageo; coloretale; gastrico. Si identificano 5 classi:

1- Mucosa normale, non neoplastica

- 2- Lesione indefinita (difficile diagnosticare se sia o meno una neoplasia)
- 3- Adenoma
- 4- Sospetto di carcinoma
- 5- Carcinoma

L'immagine di prima era di gruppo 2, non si comprendeva se fosse un carcinoma o si trattasse di atipia infiammatoria o rigenerativa.

Si raccomanda di usare la ESD per diagnosticare e rimuovere il carcinoma.

Dopo la diagnosi tramite microscopio, i giapponesi solitamente fanno un mapping basandosi su macroimmagini.

Per i **patologi occidentali** l'invasione è necessaria per la diagnosi di carcinoma; per i **patologi giapponesi** la diagnosi di carcinoma è basata su modificazioni citologiche e architetturali, ma non hanno bisogno dell'invasione. I **giapponesi** fanno **diagnosi più aggressive** di carcinoma, perché hanno più esperienza in ambito tumorale rispetto agli occidentali. Usano come prima scelta ESD/EMR perché sono procedure semplici.

Cos'è una classificazione? Qual è la sua utilità? Risposte degli studenti: per impostare una terapia; per catalogare le malattie, lo stadio, per trasferire le informazioni in modo che tutti possano capirle; per adottare dei protocolli (ad un dato stadio si fa una data terapia).

Una classificazione è qualcosa di scritto da un comitato di esperti che hanno raggiunto dei compromessi; la classificazione quindi è uno strumento per comunicare. Dovrebbe essere internazionale, generale. In effetti c'è l'OMS, che ha il compito di cercare di mettere insieme esperienze diverse. La classificazione dovrebbe esprimere le conoscenze in quel momento, però deve tenere presente che deve essere utilizzata da più paesi, quindi devo avere in qualche modo un minimo comune denominatore. Ho paesi con tecnologia e conoscenza di un certo tipo, avanzata, però le malattie devono essere trattate in tutto il mondo.

Allora ci sono dei paesi che ritengono che la classificazione prodotta in qualche modo non esprima l'insieme di conoscenze che in quel paese possono essere state raggiunte, mentre per certi altri paesi è addirittura un livello a cui si deve tendere.

Quindi la classificazione è un compromesso. Trovare una classificazione che vada bene per tutti è un bel problema: i giapponesi identificano con carcinoma una serie di lesioni che noi occidentali chiamiamo displasia. Quando poi vai a fare delle statistiche epidemiologiche, la fonte utilizzata per sapere l'incidenza di una malattia sono i registri delle diagnosi istologiche, ma se noi definiamo una lesione displasia e loro carcinoma, l'incidenza cambia. Allora uno dei tentativi recenti per cercare di limitare le differenze, è cercare di chiamare le lesioni nello stesso modo. Allora è stato proposto di chiamare molte delle displasie come "neoplasie intra-epiteliali non invasive". Oggi quindi diciamo al paziente che ha una neoplasia, spiegando che è non invasiva.

Questo serve per mettere ordine epidemiologico, anche per capire se i tassi di neoplasie nei diversi paesi sono effettivamente differenti o è semplicemente espressione di classificazioni diverse.

Un altro concetto che emerge chiarissimo è che i patologi giapponesi sono più confidenti nel formulare la diagnosi di adenocarcinoma rispetto a noi, perché usano una classificazione in maniera diversa da noi, perché quando dicono neoplasia sulle biopsie, la prima procedura che eseguono è una resezione locale; se quella diagnosi la facciamo noi parte lo stomaco e c'è quindi una bella differenza. Allora tu devi essere completamente sicuro che quella lesione che vediamo sia infiltrante, ecco perché il criterio dell'invasione è richiesto nella diagnosi che facciamo noi, perché noi facciamo partire lo stomaco, mentre i giapponesi fanno partire solo la lesione, usando una procedura che non è solo terapeutica ma anche diagnostica. Significa che su questo materiale loro hanno la possibilità di fare una diagnosi più completa su tutta la lesione; il passo successivo sarà follow-up oppure l'intervento. Questo è il motivo per cui c'è differenza nelle classificazioni (da noi serve il criterio di invasione perché la soluzione è la gastrectomia totale), perché loro hanno strumenti e possibilità che noi non abbiamo. Adesso noi ci stiamo adeguando a questa classificazione, che è propedeutica a un approccio terapeutico diverso. Tanto più questa metodica di trattamento locale prenderà piede, tanto più anche i patologi occidentali si sposteranno verso questo concetto di neoplasia, e si vedrà poi se è infiltrativa o non infiltrativa.

Quindi la classificazione è un concetto, si sviluppa come un compromesso ed è uno strumento di lavoro che noi siamo disposti a cambiare e utilizzare con una certa flessibilità.

Domanda: quello che è rimosso, se vedo che è effettivamente un cancro, cosa succede?

Riposta: se c'è invasione della sottomucosa, dopo trattamento, dipende dalla profondità dell'invasione stessa dalla muscularis mucosae verso i piani sottostanti. Se l'invasione supera 1 micrometro c'è la possibilità che vi sia una metastasi linfonodale, quindi si interviene con una resezione addizionale.

Il prof Zamboni sottolinea ancora l'innovazione della tecnica giapponese, che permette di asportare una piccola lesione e quindi indagare se proseguire con ulteriori resezioni, mentre in Italia si interviene, ad esempio a livello del colon, con operazioni più drastiche e invasive; se anche noi adottassimo questo metodo potremmo ridurre il numero delle operazioni addomino-perineali, che sono interventi molto mutilanti per il paziente. Il patologo con queste nuove tecniche potrà decidere se il paziente potrà essere curato in quel modo o meno, basandosi su criteri che ora saranno spiegati.

Slide - di un cancro coloretale: materiale ottenuto con ESD; il tumore ha invaso la sottomucosa; c'è budding (piccoli nidi di carcinoma, predittivi di metastasi).

Quindi nella diagnosi si considerano:

- Profondità dell'invasione nella sottomucosa
- (*non si capisce*)
- Volume dello stroma
- Coinvolgimento linfatico
- Coinvolgimento vascolare
- Budding
- Margini

Se i margini verticali risultano negativi:

- Adenocarcinoma tubulare, adenocarcinoma papillare

Profondità <1000 micrometri

Coinvolgimento vascolare negativo

Budding negativo

OSSERVAZIONE

- Adenocarcinoma indifferenziato, “Signe-ring cell” carcinoma, adenocarcinoma mucinoso

Profondità >1000 micrometri

Coinvolgimento vascolare positivo

Budding positivo

CONSIDERA RESEZIONE CHIRURGICA

Se i margini verticali risultano positivi: è necessaria la RESEZIONE CHIRURGICA.

Il prof. Zamboni sottolinea l'importanza di conoscere i diversi **istotipi degli adenocarcinomi**, per sapere come muoversi nella professione medica, per sapere che tipo di intervento effettuare, perché le nostre scelte operative si riflettono sulla vita dei pazienti.

1998, workshop a Vienna di patologi: prima del workshop i patologi occidentali e giapponesi hanno discusso sui tumori gastrico, coloretale ed esofageo. I risultati hanno sottolineato ancora una volta le differenze diagnostiche tra oriente e occidente. Nel carcinoma gastrico il grado di agreement fu del 37% e il coefficiente kappa 0,16; nel cancro coloretale l'agreement fu del 45%, nell'esofageo fu 14% (0,40??). Dopo che è stata creata la classificazione di Vienna, il grado di agreement è salito al 71% nel gastrico, al 55% nel coloretale e al 52% nell'esofageo.

Mostra nuovamente la biopsia mostrata in precedenza: la diagnosi dei patologi italiani è adenoma di alto grado, adenocarcinoma o iperplasia; per i giapponesi è adenocarcinoma di grande sospetto, adenoma di alto grado, adenocarcinoma.

Domanda: con questo programma di screening la mortalità per il carcinoma gastrico in Giappone è inferiore a quella in Italia?

Risposta: il carcinoma gastrico non è ora una malattia che fa paura ai giapponesi, perché è semplice da trovare e facilmente tagliato con l'endoscopia.

In Giappone il 50% dei carcinomi è diagnosticato in fase “early”, in Italia solo il 15%. Il carcinoma gastrico nel suo complesso ha una sopravvivenza a 5 anni del 35-40% qui in Italia (significa che un 60% muore); in Giappone su 100 casi fatti, il 50% sono carcinomi gastrici precoci trattati in modo locale, la sopravvivenza è del 95% a 5 anni (sono curati per sempre con una resezione).

Lezione di Anatomia Patologica del 19/12/2013 (1)

Lezione di Anatomia Patologica-19.12.2013

Professore: Giuseppe Zamboni

Sbobinatore: Marco Carraro

Revisore: Enrico Prior

DISPLASIE DELL'APPARATO GASTROINTESTINALE

L'approccio terapeutico deve andare di pari passo con l'approccio diagnostico. Quindi dobbiamo mettere in rilievo come cambiano le classificazioni cercando di capire che sono degli strumenti di lavoro che devono andare di pari passo con l'approccio terapeutico. Quando questi due fattori della pratica clinica hanno dei discostamenti o si sviluppano in tempi diversi possono generare dei problemi.

La displasia è una neoplasia che non infiltra, iniziale, che si può trovare [*audio disturbato, ndr.*]. Il concetto di displasia è quello di biomarcatore, la **displasia** è un biomarcatore istologico che si definisce come “**alterazione neoplastica inequivocabile**”: ci deve essere una riproducibilità, tutti i patologi devono poter dire che quella è una neoplasia; deve valere per tutti gli apparati. Essa deve inoltre essere non invasiva, confinata alla membrana basale.

Inequivocabile vuol dire che deve essere in grado anche di distinguerla da processi riparatori, nelle rigenerazione diminuisce il tempo di vita e aumentano le mitosi, perché di solito le cause che hanno indotto la distruzione e la proliferazione persistono e quindi la durata di vita è ridotta al punto tale che non fanno in tempo a maturare. La proliferazione e la poca maturazione contraddistinguono la neoplasia, ovvio che poi la neoplasia ha gradi di iperattività mitotica e indifferenziazione molto alti, però anche i processi reattivi hanno queste caratteristiche. Per questo le modificazioni dovrebbero essere di un livello superiore a quello atteso nei processi reattivi.

In teoria funziona bene, al microscopio meno: abbiamo delle zone grigie all'inizio e alla fine, all'inizio sarà difficile distinguere un processo reattivo da una displasia, e alla fine sarà invece difficile escludere che la lesione sia infiltrativa o potrebbero sfuggire delle piccole infiltrazioni che sono segno di neoplasia; quindi si corre il rischio di sottodiagnosticare o sopradiagnosticare la displasia. [*Discorso rielaborato, ndr.*]

Una delle aree più critiche è quella delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino, che sono correlate allo sviluppo di cancro, ovvero questi pazienti hanno un rischio maggiore di sviluppare un carcinoma rispetto alla popolazione generale. Si tratta di carcinomi diversi e subdoli che spesso è difficile identificare, anche sapendo che il paziente è a rischio. Bisogna andare a **cercare la displasia**, che però è come cercare un ago in un pagliaio perché in queste situazioni il colon, che già è grande, si riempie di processi rigenerativi, polipi, necrosi, displasie... Non è che ci sono solo displasia e epitelio normale, che anche uno studente riuscirebbe a distinguere; qui abbiamo delle displasie in colon che hanno dieci, venti anni di storia di malattia, quindi per il patologo è difficile. È difficile anche per il clinico, perché questi carcinomi non si sviluppano, come il normale carcinoma del colon, a partire da un adenoma, da un polipo facilmente identificabile. Qui il colon è pieno di polipi di tipo infiammatorio: il cancro **non insorgerà su questi polipi**. Insorgerà invece in altre regioni come piccole ulcere, difficili da trovare.

Quindi bisogna adottare un sistema classificativo e un modo di comunicare le informazioni che ci consenta di essere [registrazione disturbata, ndr.].

Allora, quando cerco la displasia, essa può essere:

- **Assente**, ovvero non la trovo;
- **Positiva**, e in questo caso devo dire se è di alto o basso grado;
- **Indefinita**, che vuol dire che è indefinita per la maggior parte dei patologi che la guardano. Questa indeterminatezza dipende dalla non sicurezza di saper distinguere il processo reattivo da un iniziale processo displastico. Ci sono atipie istologiche di incerto significato.

La capacità del medico sta anche nel saper cosa fare nel caso di displasia indeterminata, è una cosa più raffinata che si impara con l'esperienza, il sapersi orientare nelle varie sfumature di grigi, nell'indeterminatezza.

La classificazione pone problemi ma è semplice, questa è l'ultima classificazione delle displasie dell'OMS del 2010:

- Negativa
- Indeterminata
- Positiva (basso grado o alto grado)
- Neoplasia intramucosa (e dovete sapere come è fatta la sottomucosa nei vari organi per sapere cosa significa)
- Neoplasia invasiva che è quella che supera la muscularis mucosa e va in sottomucosa.

Le ultime due non sono più displasie, ma neoplasie vere e proprie.

Questa classificazione la applichiamo nelle malattie infiammatorie croniche.

Poi c'è un'altra classificazione più complessa [cfr. slide, comunque dice che non è da imparare] per tutti gli altri casi in cui ci sia displasia o malattia neoplastica iniziale (esofago di Barrett, stomaco, colon, ecc.). Perché serve questa complicazione in più?

Una classificazione semplice permette di includere in un'unica opzione terapeutica molte variabili, ad esempio se fare o no la colectomia: classificazione semplice intervento devastante.

Viceversa, se la classificazione è complessa, la terapia può essere locale e in base alle caratteristiche che la classificazione dà si possono curare i pazienti con interventi piccoli, locali (con mantenimento dell'organo) o devastanti. Quindi le indicazioni per l'intervento comprendono una accurata indagine istologica, devo sapere se c'è displasia, se questa infiltra e quanto la neoplasia infiltra, ovvero se è contenuta entro la muscularis mucosa o se infiltra anche la sottomucosa.

Voi dovrete studiare classificazioni più complesse di quelle di 5 anni fa perché le tecniche sono cambiate e il paziente ora si può giovare anche di interventi di minima.

Questo non si applica alle malattie infiammatorie croniche perché in esse non è prevista nessuna resezione parziale di questo tipo, perché queste malattie, oltre ad essere bruttissime sono caratterizzate da carcinomi non visibili che vanno cercati con biopsie casuali, senza avere aree macroscopiche, è multifocale, quindi l'alternativa dell'intervento di minima non si pone, ma si pone la colectomia. (Continua ripetere lo stesso concetto, la classificazione è semplice perché ci sono poche opzioni terapeutiche e queste sono devastanti e quindi dobbiamo essere certi della nostra diagnosi, ndr.).

La classificazione cambierà in proporzione alle nuove conoscenze e ai nuovi presidi terapeutici.

Andiamo più a fondo con la storia naturale della displasia. Displasia vuol dire modificazione citoarchitetturali, delle cellule e di come si organizzano, e si definisce al microscopio. L'esito avrà un peso che dipende dalle caratteristiche cliniche: bisogna tenere presente variabili endoscopiche (es: su colon con Crohn o su stomaco normale) e variabili cliniche.

Una mucosa può avere una mancanza di modificazioni endoscopiche, quindi bisogna fare tot di biopsie ogni tot centimetri in modo di avere una concreta probabilità di biopsare lesioni non macroscopicamente visibili.

Se la mucosa è **irregolare o atrofica** bisogna farne di più in quelle sedi perché è più alto il rischio di displasia.

Se vedo **erosioni** nello stomaco quelle sono cancro fino a prova contraria e le devo studiare; nel colon con Crohn o rettocolite ulcerosa l'erosione invece non deve attirare l'attenzione, perché queste malattie sono erosive per natura; si va quindi a biopsare la mucosa che c'è intorno.

Il Crohn non fa il cancro sull'**ulcera**; nemmeno l'ulcera gastrica dà cancro, ma il cancro gastrico è spesso sotto forma di ulcera e quindi le ulcere gastriche, a differenza delle ulcere nel Chron, vanno biopsate.

Se voi avete molto chiaro cosa è la displasia dal punto di vista teorico e visivo, poi dovete cominciare a conoscere molte altre cose per capire dove andare a cercare e quali sono i segni che aumentano la probabilità di fare ritrovamenti. Se trovate modificazioni infiammatorie diffuse, dovete almeno segnalarle al patologo perché è un campanello di allarme, perché c'è il rischio di confonderle, per il patologo, con lesioni displastiche.

Poi posso trovare **placche** che hanno un significato preoccupante il qualsiasi punto si trovino. La placca è un'area ispessita che resta rigida nella peristalsi e va biopsata sempre.

Il **polipo** non va biopsiato, va invece asportato per intero. Un polipo è una protrusione nella mucosa intestinale che può essere sessile o peduncolato e poi ci sono altre classificazioni... Per il polipo peduncolato non si usano pinze, ma un cappio che si chiama ansa diatermica, il cappio prende dentro un polipo di massimo 2,5-3 cm. Quindi se vedete un polipo peduncolato, il peduncolo è mezzo centimetro [*registrazione disturbata, ndr.*]. Il polipo è importante nello stomaco, nel colon, mentre nelle malattie infiammatorie croniche possono essercene decine, ma sono infiammatori (ad esempio polipi a ponte), e non li andiamo a cercare perché non si trova lì il cancro.

Quindi il concetto di displasia cambia a seconda del luogo e del contesto in cui la si cerca.

Nella rettocolite la displasia può essere mucosa piatta o sottomucosa rilevata, devo considerare queste possibilità. La rettocolite ulcerosa dà displasia su mucosa piatta, questa è la regola, quindi se trovo la displasia su un polipo e dico che è un adenoma, devo prima sincerarmi che la mucosa piatta intorno sia normale, poi l'adenoma si analizza comunque, ma intanto si risparmia il colon. Se la mucosa è normale il polipo è insorto lì, ma mi posso limitare a portare via il polipo e non l'intero colon.

Se viceversa questa displasia la trovo in una DALM, che significa che la displasia è non piatta, ma è associata a una lesione a o una massa (che è una lesione protrudente e voluminosa). Ad esempio dopo che ho biopsato un'ulcera, il campanello di allarme è che possa essere un carcinoma ulcerato. Quando trovo una displasia su un'ulcera o su una massa, anche non invasiva, la probabilità che sia già cancro è altissima, quindi si fa la colectomia. Quindi quando si trova displasia su mucosa piatta devo distinguere il grado, alto o basso, quando la trovo su una massa o su un'ulcera si fa direttamente la colectomia.

Se invece trovo una displasia associata ad una lesione che giudico sia sporadica o possa essere un adenoma, il paziente non viene colectomizzato ma deve fare una colonscopia a sei mesi e dobbiamo seguirlo per sempre e il rischio aumenta col tempo.

Quando troviamo la displasia di alto grado su mucosa piatta è imperativo l'intervento perché la displasia è un marcatore di una situazione che colpisce tutto il colon. Quella displasia, che nel punto biopsiato non è ancora invasiva, nel 40-60% dei casi, è già in fase più avanzate in altre sedi, è già un carcinoma. Questo è il motivo vero per cui si va diretti in colectomia, si spera di essere arrivati alla diagnosi in tempo ancora utile ma potremmo essere anche arrivati troppo tardi.

Ogni anno di malattia (infiammatoria cronica) aumenta il rischio. Il rischio del paziente aumenta anche in base a criteri clinici, guardate la tabella.

I carcinoma nella RCU ha caratteristiche diverse rispetto a quello sporadico, sono **multifocali**, per questo la colectomia deve essere totale; sono irregolari, poco delimitati, hanno alta tendenza ad infiltrare, possono essere o polipoidi o piatti, posso avere neoplasie sincrone. Posso avere istotipi poco frequenti, fino al 15-30% di istotipo colloide o istotipi a cellule disperse che sono rarissimi nel colon normale, anche se sono tipici nello stomaco. Se le cellule sono disperse hanno di solito alta tendenza a metastatizzare ematicamente.

Il tumore di Krukenberg lo troverete sia in ginecologia sia in gastroenterologia. È un tumore bilaterale dell'ovaio che può essere il primo segno di tumore a cellule disperse e si sa per certo che non origina nell'ovaio e bisogna andare a cercarlo. Le probabilità più alte di trovare la sede primaria si hanno ad esempio nello **stomaco**, dove il carcinoma a cellule disperse è uno dei due tipi di carcinoma gastrico. Nello stomaco si trova però molto in ritardo con gastroscopia, solo in fase tardiva fa le ulcere. Nel frattempo bisogna cercarlo da altre parti che sono tutte meno frequenti, la seconda cosa da fare (nella donna) è guardare la **mammella** (con ecografia e mammografia) che è la seconda sede in ordine di frequenza (e può essere difficilmente identificabile), al terzo posto c'è l'**appendice**. Nel colon si arriva solo per disperazione perché è difficilissimo trovare un tumore a cellule disperse sporadico nel colon, l'eccezione sono le malattie infiammatorie croniche, dove è relativamente frequente. Se a un esame vi chiedono cos'è il Krukenberg dovete anche dire che lo cercate su base di queste probabilità, che dovete imparare.

Nel colon, da protocollo, bisogna fare minimo 32 biopsie, 4 biopsie ogni 10 cm (ogni 4cm nel retto-sigma, che è la sede più frequente del cancro). Si cerca soprattutto in casi di malattia di lunga durata (oltre 10 anni).

Il carcinoma invasivo intramucoso supera la membrana basale, ma resta nella mucosa, c'è un rischio di invasione linfatica e in questo caso la resezione è necessaria; nuove metodiche endoscopiche potrebbero consentire un trattamento più adeguato (nuova classificazione a nuove terapie). Se va in sottomucosa è invasivo ed aumenta il rischio di metastasi per via ematica, ma ancora una volta potrebbe bastare un intervento di minima e poi si vedrà.

Lo schema nuove classificazioni a nuove terapie si applica nell'esofago di Barrett, che è una zona di mucosa colonnare endoscopicamente visibile, perché una mucosa colonnare fa trasparire meglio il colore del sangue rispetto ad una squamosa e quindi appare più rosso (invece che rosa); bisogna fare biopsia e avere la conferma che si tratta di metaplasia, perché si parli di adenocarcinoma la metaplasia deve essere **intestinale** (non gastrica).

Quindi, prima c'è la metaplasia gastrica che cerca di proteggere dall'acidità da reflusso, poi diventa intestinale e su questa si sviluppa l'adenocarcinoma (ovvero il Barrett).

Il Barrett è solo una condizione clinica a rischio, predisponente; diventerà una lesione preneoplastica quando sviluppa displasia e, dato che qui la displasia si sviluppa più frequentemente che in un esofago normale, la displasia la andiamo a cercare qui. Ancora una volta non ci sono grosse guide macroscopiche, ci sono delle colorazioni speciali, prima si faceva col blu, ora con luce polarizzata. La diagnosi di esofago di Barrett ha rilevanza clinica perché i pazienti li devo controllare per tutta la vita, in quanto hanno maggior rischio di sviluppare cancro. Per la diagnosi devo dire se c'è metaplasia intestinale, in quanto solo questa è associata al rischio di

cancro (quella gastrica non lo è) e solo questi avranno necessità di controllo. Se estendendosi il concetto di condizione di rischio ci sarebbero effetti negativi sia economici (costa di più fare controlli), sia psicologici per il paziente (si crea allarme inutilmente).

I fattori che influenzano il tipo di trattamento sono sempre basati sugli stessi concetti, sappiamo che la displasia di alto grado può andare incontro a cancro, ma se il rischio è che il paziente muoia nell'intervento è meglio che si tenga solo il rischio di cancro. L'età conta, i pazienti col Barrett sono spesso anziani e hanno spesso comorbidità che vanno valutate. Il rischio dell'intervento cambia sulla base del livello di specializzazione del reparto in quel campo. Il rischio cambia anche sulla base dei servizi di controllo che sappiano seguire adeguatamente il paziente e definire la condizione. Dipende anche dalla estensione della displasia, dalla sede, dal fatto che la displasia sia stata trovata su ulcera, nodulo o altro. Trovare la displasia su ulcera o nodulo aumenta il rischio, quindi è indicazione al trattamento.

Le metodiche locali consistono nel circondare la lesione con l'ansa e sollevarla con fisiologica per renderla asportabile con l'ansa diatermica; il buco che rimane verrà coperto dalla rigenerazione epiteliale.

Il pezzo operatorio va valutato istologicamente, su base di infiltrazioni, aspetto delle cellule. Se la lesione supera la muscolatura mucosa bisogna misurare le dimensioni della mucosa e si parla di carcinoma invasivo sottomucoso. In questo caso bisogna valutare l'operazione, ma questi pazienti sono a rischio di metastasi, bisogna quindi vedere se è differenziato, se ci sono invasioni vascolari, se cresce in maniera infiltrativa o espansiva, se cresce vicino al margine eccetera. Poi si considera il paziente: giovane, anziano, a rischio... Poi chi ha il contatto col paziente gli deve fornire il rischio di metastasi paragonato a quello dell'intervento chirurgico e alle prospettive di vita senza lo stomaco e poi insieme si sceglie la strada.

Adesso cominciamo anche noi a fare approcci più complessi.

Questo è un caso di Negrar, uomo, 69 anni con esofagite da reflusso da molti anni ed è in follow up da 5 anni per Barrett, sono state effettuate biopsie su questo esofago rosso, che non è epitelio esofageo se è rosso... Su questa biopsia, si vede che l'epitelio non è pavimentoso composto, ci sono ghiandole (che normalmente non ci sono) con nuclei blu spiccati e ci sono mitosi ed erosioni, quindi è un caso infiammatorio che può essere reattivo o neoplastico. Quindi si descrivono le modificazioni displastiche e si dovrebbe essere in condizione di considerare queste lesioni inequivocabilmente displastiche.

Si dà quindi via libera al clinico di intervento di esofagectomia, è molto complesso, bisogna aprire addome e torace e ci sono mortalità e morbilità alte. Altrimenti, dato che la lesione era di seconda categoria, 2A, era poco rilevata, con uno zoom elettronico si riesce mettere in evidenza le foveole, i pattern delle foveole e si può circoscrivere così la lesione e marcarla in endoscopia. Poi si infila con dell'acqua, si mette sopra una campana con un anello elastico e comincia la resezione; poi il pezzo lo manda in anatomia patologica e viene di nuovo analizzato e classificato. In questo caso era una displasia di alto grado, che non ha infiltrato la sottomucosa. Se va in sottomucosa si valuta il rischio di metastasi e poi si procede di conseguenza.

Domanda: Le tecniche di biologia molecolare possono essere utili a discriminare fra displasia ad alto grado e displasia a basso grado?

Risposta: Le tecniche di biologia molecolare possono essere utili, le usiamo sia in immunohistochimica, si guarda soprattutto la p53, mutata di solito nelle displasie di alto grado. Quindi si può usare nelle differenziali insieme all'esame microscopico, p67 che è un indice di proliferazione, p21 e p53, per vedere se espressa nel nucleo come espressione di mutazione. p53 indica attività di proliferazione, con l'esame istologico standard, poi ci possono essere esami di biologia molecolare che diventeranno più affidabili, ma al momento non aiutano molto nel discriminare displasia da non displasia perché è un processo lineare e non c'è un cut-off.

Casi in cui le classificazioni diagnostiche non vanno di pari passo con la terapia.

Il linfoma MALT può essere curato in fase iniziale con terapia antibiotica e antisecretiva perché dipende dall'*Helicobacter pylori*, (ciò sarebbe stata considerata una bestialità per quanto noi sapevamo fino a qualche tempo fa).

Prima avevamo biopsie gastriche e infiltrato linfoide, avevamo tecniche per vedere le catene kappa o lambda e se ce n'era solo una era linfoma. Il linfoma nello stomaco si curava con resezione gastrica, quindi noi facevamo una **diagnosi sofisticatissima** con la **chirurgia del '900 (gastroresezione)**. Sono partiti tantissimi stomaci perché la nostra diagnosi era raffinata, ma la terapia no.

Si è poi scoperta che la popolazione monoclonale spariva con l'*Helicobacter*, e quindi ora i pazienti si curano con la terapia antibiotica.

Quindi deve esserci una concordanza tra la sofisticatezza delle tecniche di diagnosi e quelle di conoscenza biologica della malattia e terapia. Le classificazioni sono uno strumento che consente di proporre terapie al passo con i tempi.

Per questi motivi la "medicalizzazione" dei pazienti (ovvero andare a cercare cose che poi non si sa come trattare) è molto pericolosa (ad esempio le campagne di screening per prostata e noduli alla tiroide). Quindi prima di fare uno screening bisogna valutare se è veramente utile.

Buone vacanze, buono studio e buon esame.